Beitrag zur Analytik der Chinarinde

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Roland Bitsch
aus Ober-Ostern/Odenwald

Marburg/Lahn 1968

1969

E. Symon · Foto-Druck · 355 Marburg/L. · Friedrichsstr. 3

Beitrag zur Analytik der Chinarinde

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Roland Bitsch
aus Ober-Ostern/Odenwald

Marburg/Lahn 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am: 19. Januar 1969
Tag der mündlichen Prüfung : 5. Februar 1969
Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. h. c. H.Böhme
Mitberichterstatter : Prof. Dr. C. Mahr

Meinen Eltern sowie

meiner lieben Frau gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. Böhme

angefertigt.

Für sein stets wohlwollendes Entgegenkommen und seine großzügige Hilfe und Förderung möchte ich meinem verehrten Lehrer an dieser Stelle aufrichtig danken.

Ferner gilt mein Dank den Firmen C.F.Boehringer und Söhne/Mannheim, Buchler/Braunschweig und M.Woelm/Eschwege für die Überlassung von China-Alkaloiden und Sorbentien zur Chromatographie.

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil:

		Seite
1.	Wirtschaftliche und pharmakologische Bedeutung der Chinarinde	1
1.1.	Geschichte des Chinarindenanbaus	1
1.2.	Entstehung des Chininsyndikats	5
1.3.	Pharmakologie der China-Alkaloide	7
2.	Quantitative Bestimmungsmethoden des Chinins	13
2.1.	Die Internationale Standardmethode	13
2.2.	Neuere Bestimmungsmethoden	14
2.3.	Nachteile der Bestimmungsmethoden	16
3.	Dünnschichtchromatographische Trennungsversuche der China-Alkaloide	19
3.1.	Schmelzpunkte und UV-Spektren der Alkaloidbasen	20
3.2.	Konfiguration der China-Alkaloide	25
3.3.	Dünnschichtchromatographie der Chinabasen auf Kieselgel G	28
4.	Quantitative Dünnschichtchromatographie der China-Alkaloide	35
4.1.	Bisherige Versuche zur quantitativ dünnschichtchromatographischen Bestimmung von China-Alkaloiden	37
4.2.	"Umkehrentwicklung" zur Abtrennung des Chinins für quantitative Bestimmungen	38
4.3.	Elution der Flecken über Mikrochromatographiersäulen	43
4.4.	Wahl des geeigneten Elutionsmittels	45

Seite

4.5. Statistische Auswertung der Eichkurve für die photometrische Bestimmung des Chinins 49

4.5.1. Eichkurve ohne chromatographische Elution des Chinins 49

4.5.2. Eichkurve nach chromatographischer Elution des Chinins 53

4.5.3. Vergleich zwischen beiden Eichkurven 56

4.6. Fluorimetrische Chininbestimmung 58

4.7. Quantitative Chininbestimmung aus Chinarinden 61

4.7.1. Vergleich zwischen der quantitativen Dünnschichtchromatographie und der Internationalen Standardmethode 61

4.7.2. Quantitative Dünnschichtchromatographie der bei der Internationalen Standardmethode erhaltenen Tartrate 67

4.7.3. Diskussion der Ergebnisse 72

4.7.4. Zuverlässigkeitskontrolle der quantitativen Dünnschichtchromatographie 74

4.7.5. Statistische Überprüfung der Ergebnisse, Ermittlung des Bestimmungsfehlers und des kleinsten, gesichert nachweisbaren Meßwerts 76

4.7.6. Vorteile der quantitativen dünnschichtchromatographischen Chininbestimmung gegenüber der Internationalen Standardmethode 77

5. Untersuchung von Chinin und Chinidin nach dem DAB 7 - Reinigung der Basen - 79

5.1. Nachweis von Hydrochinin und Hydrochinidin 79

5.1.1. Die Bromtitration des Arzneibuchs 79

5.1.2. Dünnschichtchromatographische Prüfung auf Dihydrobasen 80

Seite

5.1.3. Reinheitsprüfung von Handelspräparaten 81

5.2. Reinigungsverfahren für Chinin und Chinidin 84

5.2.1. Die Quecksilberacetatmethode 84

5.2.2. Reinigung der Basen durch Präparative Schichtchromatographie 88

5.2.3. Infrarot- und Kernresonanzspektren der gereinigten Chinabasen 97

5.3. Prüfung von Chinidinsulfat mit Silbernitrat 103

Zusammenfassung 106

Praktischer Teil

1. Umkristallisation der Alkaloidbasen 111

2. Chromatographiebedingungen 112

3. Spektroskopie der Alkaloidbasen - Absorptionsspektren von Chinin und Cinchonin 113

4. Reinigungsmethoden für Chinin, Chinidin, Hydrochinin und Hydrochinidin 122

5. Analysenverfahren 124

5.1. Internationale Standardmethode 124

5.2. Quantitative dünnschichtchromatographische Bestimmung der nach der Internationalen Standardmethode erhaltenen Tartrate 128

5.3. Dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung des Chiningehalts in Chinarinden 129

6. Spezifische Drehung der präparativ schichtchromatographisch gereinigten Basen 134

Seite

Gehalt an Hydrobasen, Schmelzpunkte und Spezifische Drehung verschiedener Chinin- und Chinidinpräparate des Handels 145

Elution über Mikrochromatographiersäulen - Ausbeute an Chinin bei Anwendung verschiedener Elutionsmittel 149

Quantitative Chininbestimmung aus Alkaloidgemischen 156

Fluoreszenzspektrum von Chinin 157

Fluoreszenzmessung von Chinin in Alkaloidgemischen nach dünnschichtchromatographischer Trennung 158

7. Prüfung von Chinidin mit Silbernitrat 158

8. Statistische Prüfverfahren 162

9. Statistische Auswertung der Eichkurve für die photometrische Bestimmung des Chinins ohne Dünnschichtchromatographie 168

10. Statistische Auswertung der Eichkurve zur photometrischen Bestimmung des Chinins nach dünnschichtchromatographischer Elution 173

11. Statistische Auswertung der Quantitativen Chininbestimmung aus verschiedenen Chinarinden 179

12. Bestimmung des Verfahrensfehlers der untersuchten Drogenmuster 184

13. Berechnung des kleinsten noch gesichert nachweisbaren Meßwertes 190

Theoretischer Teil

1. Wirtschaftliche und pharmakologische Bedeutung der Chinarinde.

1.1. Geschichte des Chinarindenanbaus.

Untersuchungen über quantitative Bestimmungsmethoden der China-Alkaloide haben in jüngster Zeit eine unerwartete Aktualität erfahren, die bis in die Tageszeitungen Eingang gefunden hat [15) 71) 72) 73) 89)].

In den Jahren von 1963 - 1967 wurden Arzneimittelhersteller, Grossisten und Apotheker durch ein ruckartiges Ansteigen des Chininpreises auf dem Weltmarkt beunruhigt. Der Preis für Chininbase erhöhte sich um etwa das 10-fache, Chininpräparate verteuerten sich dementsprechend.

Diesbezügliche Meldungen der Tagespresse machten anfänglich den steigenden Bedarf des Vietnamkrieges an chininhaltigen Medikamenten, verbunden mit der sinkenden Ausfuhr des Hauptlieferanten Indonesien, verantwortlich für diese Preisentwicklung.

Bald aber verdichteten sich Vermutungen, daß noch andere Faktoren bei der Preisgestaltung eine Rolle spielten. Eingehende Untersuchungen enthüllten schließlich ein weltweites „Chininkartell", das den Chinarindenexport ebenso wie die Verarbeitung zu Chinin umfaßte.

Die Kartellspitze bestand aus einem niederländischen Unternehmen. Beteiligt waren ferner französische, britische und

deutsche Firmen. Die Gruppe beherrschte nahezu den gesamten Weltmarkt. Absprachen wurden getroffen, die vom Rohstoffangebot, Absatz der Fertigprodukte, Aufteilung des Marktes, Preisgestaltung, Rabattgewährung, Exportquoten, bis zu Methoden für die Unterdrückung unerwünschter Konkurrenz reichten.

Die Entstehung dieses Kartells läßt sich bis in das Jahr 1892 zurückverfolgen. Sie hat ihre Ursache in der ökologischen und agrikulturellen Differenzierung des Rohstoffs Chinarinde, die wirtschaftspolitische Folgerungen nach sich zog und der Droge frühzeitig eine besondere Marktstellung verschaffte.

Bei kaum einer anderen Arzneidroge sind Anbau und Aufzucht mit solchen Schwierigkeiten vielfältigster Art verknüpft wie gerade bei der Cinchonapflanze: Schwierigkeiten, bedingt durch Anfälligkeit gegenüber klimatischen Schwankungen, Änderungen in der Bodenbeschaffenheit, gegenüber Pflanzenkrankheiten, sowie pflanzlichen und tierischen Schädlingen. Oft genug treten katastrophale Rückschläge ein, deren Tragweite deutlich wird, wenn man sich vor Augen hält, daß von der Aussaat bis zur Ernte der Rinde 12-15 Jahre vergehen. Die genannten Ursachen sind für die Bildung des oben erwähnten Monopols mitverantwortlich und mögen in einem kurzen historischen Streifzug skizziert werden.

Etwa ein Drittel der Erdbevölkerung ist auch heute noch von der Malaria befallen, die wohl die am weitesten verbreitete Seuche auf der Welt ist und in unterentwickelten Gebieten zahllose Todesopfer fordert. Schwere endemische Malaria-

herde finden sich insbesondere in Süd-Amerika, Afrika (Kongogebiet), und in Südost-Asien.

Für mehr als 3 Jahrhunderte war die Chinarinde das einzige Mittel zur Bekämpfung dieser Seuche. Größere Bedeutung erlangte sie zu Anfang des 19. Jahrhunderts, als mit der beginnenden Kolonialisierung der Handel mit den tropischen Ländern eine wirksame Bekämpfung der Malaria notwendig werden ließ.

Bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts besaßen die südamerikanischen Herkunftsländer, hauptsächlich Bolivien und Peru, in geringerem Umfang Ecuador und Venezuela, das Exportmonopol für Chinarinde. Durch den dort betriebenen Raubbau waren die wildwachsenden Cinchonabestände bald von der Ausrottung bedroht. Diese Umstände und die steigende Nachfrage bewogen die holländische Regierung schließlich zur planmäßigen Anpflanzung und Züchtung auf Java.

In den Jahren 1860 - 1870 wurde dort durch intensive Zuchtversuche der Chiningehalt der Cinchonabäume systematisch gesteigert. Es war das erste Mal in der Geschichte, daß an einer Pflanze Züchtungsversuche unternommen wurden; die Mendelschen Gesetze waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Die Versuche wurden zuerst an Cinchona officinalis, Cinchona calisaya und Cinchona pahudiana durchgeführt, die als einzige zur Verfügung standen. Einige Zahlen mögen als Beispiel dienen:
Der Chiningehalt der Pflanzen, die für Zuchtversuche angebaut werden durften, betrug[14])

im Jahre 1873 ----- mehr als 5 %

im Jahre 1875 ----- mehr als 7,5 %

im Jahre 1877 ----- 9 - 10 %

Bereits 1879 waren mehrere Exemplare mit einem Chiningehalt von 13,5 % vorhanden. Zehn Jahre nach dem ersten Anbau wurde die wertvollste Art, Cinchona ledgeriana, von der holländischen Regierung erworben. Später kam noch Cinchona succirubra hinzu. Durch Pfropfung von Cinchona ledgeriana auf Succirubra-Unterlage gelang es dann, den Chiningehalt einzelner Bäume bis auf 20 % zu erhöhen[14]. Diese Zuchtform hat heute alle anderen Arten nahezu verdrängt bis auf Cinchona calisaya, die noch eine gewisse Rolle spielt, und daneben noch verschiedene widerstandsfähige Hybriden.

Die Erfolge in Zucht und Kultur der Chinarinde auf Java verschafften der niederländischen Regierung einen jahrzehntelangen Vorsprung vor anderen Anbauländern. Der entscheidende Anteil der deutschen Botaniker Haßkarl und Junghuhn an diesem Erfolg sei nur kurz erwähnt. Ausführliche Darstellungen über Anbau, Zucht und Gewinnung der Chinarinde, sowie die abenteuerliche Geschichte ihrer Entführung aus Südamerika nach Java finden sich in zahlreichen Büchern und Veröffentlichungen[5) 7) 14) 17) 31) 44) 50) 57) 101)].

Andere Anbaugebiete spielten zu dieser Zeit eine geringe Rolle. Anpflanzungen in Algerien z.B. schlugen völlig fehl wegen unzureichender Klima- und Bodenverhältnisse. Vorderindische und ceylonesische Produkte konnten sich auf dem Weltmarkt infolge ihres niedrigen Chiningehalts nicht durch-

setzen; Züchtungsversuche zur Ertragssteigerung waren unterblieben. Einem momentanen Exportanstieg der ceylonesischen Rinde folgte ein rascher Rückgang, der schließlich die Aufgabe und Vernichtung der dortigen Cinchonakulturen zur Folge hatte. Die Chinarinde aus Java beherrschte schließlich mit einem Anteil von 90 % den Weltmarkt nahezu völlig.

Das steigende Angebot führte in den Jahren 1880 - 90 zu einem scharfen Preisrückgang. Der Preisindex fiel auf weniger als 10 % seines ursprünglichen Wertes[14]. Eine solche Entwicklung mußte für die Cinchona-Monokulturen Javas auf die Dauer verheerende Auswirkungen haben.

1.2. Entstehung des Chinin - Syndikats.

Bereits 1892 hatten sich aus diesen Gründen verschiedene holländische und deutsche Chininfabrikanten zusammengeschlossen. Hierdurch wurden freilich gewisse Spannungen zwischen Rindenproduzenten und Chininherstellern nicht beseitigt. Schließlich kam es 1913 zur ersten „Kina-Overeenkomst" zwischen Pflanzern und Chininherstellern, die zuerst auf 5 Jahre befristet war, später mehrfach erneuert und verlängert wurde. Vertragsteilnehmer waren[14]:

Vereeniging van Kinabast-Produzenten, Amsterdam
Amsterdamsche Kininefabriek, Amsterdam
Nederlandsche Kininefabriek, Maarsen
Bandoengsche Kininefabriek, Semarang (Java)

11 Chininfabrikanten, darunter auch zwei deutsche Firmen, durch besondere Abmachungen von den niederländischen Fabrikanten verpflichtet.

Der Zusammenschluß stand unter der Protektion des niederländischen Staates. Im Laufe der Zeit entstand ein umfangreiches Vertragswerk. Die Verträge wurden bis ins kleinste Detail ausgearbeitet. "Mit einer geradezu einzig dastehenden Genauigkeit wurden in fast 200 Paragraphen die Interessen der Pflanzer und der Fabrikanten abgegrenzt. Die aufs allerfeinste ausgeklügelten Bestimmungen ..... bildeten die Grundlage für die unerschütterlich gebliebene Monopolstellung Niederländisch-Indiens (Dethloff)[14]."

Das Chinin-Syndikat war geboren und "wurde im Lauf der Zeit zur vielleicht wissenschaftlichsten Organisation für ein kontrolliertes Rohstoffangebot und die Verteilung des aus ihm hergestellten Fertigproduktes (SPIEGEL)[89]." Verwaltungsspitze dieses Kartells war das "Kinabüro" in Amsterdam. Daneben wurde noch eine Chininkonvention ins Leben gerufen, der nur die Chininhersteller angehörten, und die den Gesamtverkauf der Chininpräparate regelte.

Die Machtstellung des Syndikats war so groß, daß z.B. ganze Jahresernten aus Anbaugebieten Ostafrikas und Boliviens, die dem Kartell nicht angehörten, kurzerhand aufgekauft wurden, um den Preis stabil zu halten.[14]

Das Syndikat überlebte beide Weltkriege. Erst mit der Unabhängigkeit Indonesiens traten gewisse Schwierigkeiten auf. Durch innenpolitische Krisen wurde die Zusammenarbeit zwischen

Cinchonapflanzern in Indonesien und Chininproduzenten erschwert. Der Marktanteil der indonesischen Rinde ging schließlich von 90 % auf 60 % zurück[50].

1959/60 wurde dann die Chininkonvention der Produzenten neu gegründet, die auch ohne die Pflanzer noch mächtig genug war, wie zu Anfang gezeigt wurde[15) 71) 72) 73) 89].

Seit dem 2. Weltkrieg, als durch die Besetzung der Japaner Indonesiens Ausfuhr blockiert war, wurden neue Anbaugebiete für Chinarinde in Indien, Ceylon, Belgisch-Kongo, Kamerun, San Thome, Guinea und Madagaskar geschaffen. Auch in Süd-Amerika, in Bolivien, Peru und Ecuador, wurden Kulturen angelegt[43) 44].

1.3. Pharmakologie der China-Alkaloide.

Bis in die dreißiger Jahre besaß Chinin als Hauptalkaloid der Chinarinde eine Vorzugsstellung als Antimalariamittel. Man kann es in gewisser Weise als das erste Chemotherapeutikum bezeichnen. Durch die in Deutschland neu entwickelten synthetischen Antimalariamittel Atebrin®, Plasmochin® und Resochin® wurde Chinin in den Hintergrund gedrängt. Später kamen noch amerikanische Produkte wie Proguanil (Paludrin) und Pyrimethamin (Daraprim) hinzu.

Chinin vermag nur die Blut-Schizonten verschiedener Malariaerreger abzutöten und damit den Anfall zu unterdrücken. Der Patient ist aber nach wie vor Infektionsträger,

da die Gameten und die exoerythrozytären Formen (Gewebsschizonten) unbeeinflußt bleiben. In ähnlicher Weise wirken Atebrin® und Resochin®. Diese Mittel beseitigen also nur das klinische Erscheinungsbild, den Malariaanfall, der mit hohem Fieber verbunden ist. Man nennt eine solche Therapie daher auch "Supressivbehandlung" [27) 54)].

Durch die Entwicklung von Plasmochin®, Proguanil und Pyrimethamin ist es möglich geworden, die Gameten und die exoerythrozytären Formen der Malariaerreger abzutöten, ohne jedoch die Schizonten zu beeinflussen. Erst die Kombination eines Schizonten- mit einem Gametenmittel bewirkt eine völlige Heilung der Malaria (Radikalkur).

Die durch den Stich der Anophelesmücke primär übertragenen Sporozoiten sind bislang noch durch kein Mittel zu beseitigen.

Chinin besitzt zahlreiche Nebenwirkungen; man kann es allgemein als generelles Protoplasmagift bezeichnen[27)53)54)91)]. Von der Vielzahl der beobachteten Wirkungen seien genannt:

a) Unterdrückung einer Reihe von enzymatischen Prozessen; damit zusammenhängend
b) Hemmung des Eiweißumsatzes und der Stickstoffausscheidung, wodurch wieder Gewebsatmung und Stoffwechsel vermindert werden
c) Reduktion der Ziliarbewegung der Epithelien
d) Verhinderung des Wachstums von Fibroblasten in Gewebekulturen

e) Toxizität für einzellige Organismen wie Infusorien, Hefen, Spermatozoen, Trypanosomen und Plasmodien (bakterizide Wirkung)

f) antipyretische und analgetische Eigenschaften

g) geringe Beeinflussung der peripheren sensiblen Nervenendigungen (Lokalanästhesie)

Auf die glatte Muskulatur wirkt Chinin in kleinen Dosen erregend, in großen lähmend. Daher wurde es früher in der Geburtshilfe als wehenförderndes Mittel eingesetzt. Tonussteigerung läßt sich allerdings nur am wehenbereiten Uterus beobachten, an andern Organen der glatten Muskulatur, ebenso auch am Herzen, tritt nur der lähmende Effekt hervor[53) 54)]. Die abortive Wirkung des Chinins ist umstritten und läßt sich wohl nur in Dosen erreichen, die zu einer allgemeinen Vergiftung führen.

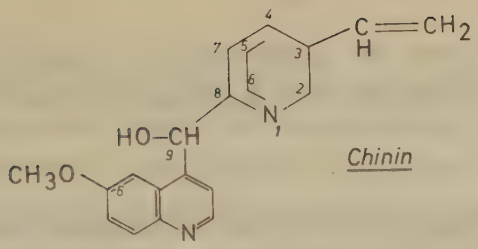
Zu erwähnen ist schließlich noch die Wirkung als Roborans (Stomachicum), die zur Aufnahme der Tinctura Chinae comp. ins DAB 7 geführt hat. Appetitanregung wird auch hier nur durch kleine Dosen bewirkt und ist der Bitterkeit und mild irritierenden Wirkung des Chinins zuzuschreiben. Durch große Dosen wird die Magensekretion unterbunden[27) 53) 54) 91)].

Wegen seiner zahlreichen Nebenwirkungen wird Chinin heute nur noch selten als Malariamittel eingesetzt und ist in dieser Eigenschaft abgelöst worden von den oben beschriebenen synthetischen Substanzen, die sowohl in unterdrückender wie auch in ihrer therapeutischen Wirkung spezifischer, besser verträglich und weniger toxisch sind als Chinin.

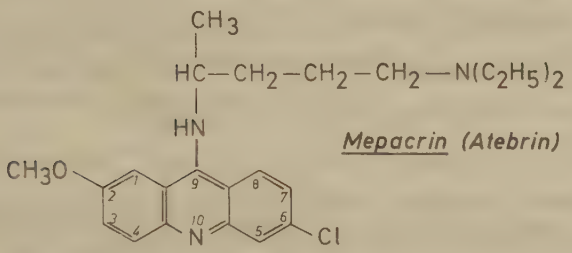
Nichts destoweniger ist Chinin in weiten Gebieten der Welt auch heute noch die einzige Malariadroge, da synthetische Präparate fehlen oder unerschwinglich sind[27].

Erst in jüngster Zeit gewinnt Chinin wieder weltweites Interesse, seit sich herausgestellt hat, daß bestimmte Malariaformen - insbesondere in Südost-Asien (Vietnamkrieg) - resistent sind gegen synthetische Mittel, nicht aber gegen Chinin[2]. Goodman und Gilman[27] weisen darauf hin, daß Chinin wertvoll bei der Behandlung von Infektionen mit gewissen Stämmen von Plasmodium falciparum ist, des Erregers der gefährlichen und oft tödlich verlaufenden malignen Malaria tertiana oder tropica, die sich als resistent gegenüber allen andern kommerziellen Antimalariamitteln gezeigt haben. Bei dieser Malariaform gehen alle exoerythrozytären Formen ins Blut über und es genügt die Verabreichung eines Schizontenmittels[54].

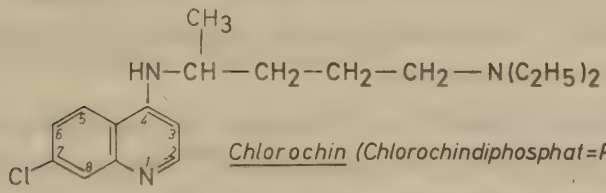
In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit berichtet Asshauer[2], daß Chininresistenz bislang noch bei keinem Malariaerreger beobachtet wurde, wohl aber Resistenz der verschiedensten Erreger gegen nahezu alle bekannten synthetischen Mittel. Als Standardtherapie für die US-Truppen in Vietnam wird augenblicklich eine Kombination von Chinin und Pyrimethamin angewendet mit einer Heilungsquote von 90 % - 95 %. "Das als veraltet abgeschriebene älteste Malariamittel Chinin hat somit ..... eine neue Bedeutung gewonnen (Asshauer)."



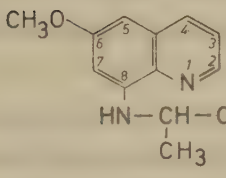
Chinin



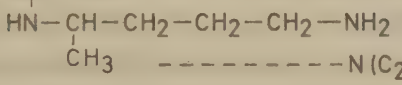
Mepacrin (Atebrin)



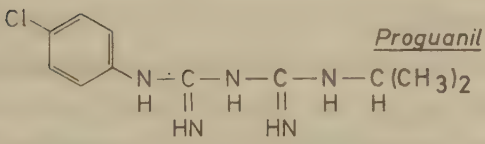
Chlorochin (Chlorochindiphosphat=Resochin)



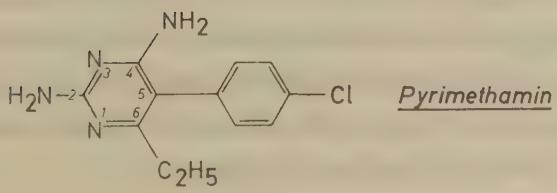
Primachin



Plasmochin



Proguanil



Pyrimethamin

Über Angriffspunkt und -mechanismus des Chinins wie auch der synthetischen Malariamittel am Erreger ist noch wenig bekannt.

Die pharmakologische Wirkung der wichtigstens Nebenalkaloide der Chinarinde: Chinidin, Cinchonin, Cinchonidin, Hydrochinin und Hydrochinidin ist nach Meinung einschlägiger Autoren ähnlich der des Chinins[27) 34) 53) 54) 91)]. Unterschiedlich und z.T. sehr umstritten ist nur der Wirkungs g r a d der Substanzen. So hat nach Goodman und Gilman[27)] Chinidin doppelte Antimalariawirkung verglichen mit Chinin, Cinchonin und Cinchonidin haben eine halb so große. Hegner, Shaw und Manwell[34)] fanden nachstehende Reihenfolge in der Abnahme der Antimalariawirkung:

Chinin > Chinidin > Cinchonin > Cinchonidin

Nach Buttle, Henry und Trevan[34)] verläuft die Abnahme der Antimalariawirksamkeit folgendermaßen:

Hydrochinin > Chinin > Hydrochinidin > Cinchonidin und Chinidin > Cinchonin.

Untersuchungen des British Medical Research Council[34)] schließlich ergaben die praktische Gleichwertigkeit von Chinin und Chinidin.

Die abweichenden Ergebnisse sind auf verschiedene Ursachen zurückzuführen:

a) Mangelhafter Reinheitsgrad der untersuchten Substanzen
b) Prüfung an verschiedenen Gattungen von Malariaerregern
c) Prüfung an sehr unterschiedlichen Tierspezies
d) Ergebnisse aus Tierversuchen lassen sich nicht ohne Vorbehalt auf den Menschen übertragen.

Übereinstimmend wird die Wirkung des Chinidins auf das Herz beurteilt. Chinidin übertrifft Chinin in seiner Wirkung auf die Funktion des Herzens und wird daher erfolgreich bei Herzarrhythmien eingesetzt. Es beeinflußt sämtliche Elemente der Herzfunktion in negativem Sinne: Erregbarkeit des Reizbildungszentrums, Reizleitungsgeschwindigkeit, Dauer der Refraktärperiode. Ebenso wird auch die Kontraktilität des Herzmuskels vermindert[53) 54)].

2. Quantitative Bestimmungsmethoden des Chinins.

2.1. Die Internationale Standardmethode.

Nachdem Pelletier und Caventou[68)] das Chinin isoliert, Liebig[58)] und Regnault[83)] sowie Strecker[94)] die Summenformel aufgestellt hatten, wurden auch bald erste Versuche einer quantitativen Bestimmung des Chinins unternommen, das man als Hauptalkaloid und wirksames Prinzip der Chinarinde ansah. Diese Versuche liegen mehr als 100 Jahre zurück, und bis heute ist noch kein allseits befriedigendes Ergebnis erreicht worden. Die Schwierigkeiten liegen vor allem darin, das Chinin vollständig von seinen Nebenalkaloiden abzutrennen, die in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften z.T. große Ähnlichkeit mit diesem aufweisen.

Besonders die Holländer waren an einer Chininbestimmung interessiert, die ihnen die Möglichkeit gab, die Qualitätssteigerung der Cinchona-Kulturen auf Java zu kontrollieren

und den Chininfabriken möglichst hochwertige Rinde zu liefern. Während die Mehrzahl der Arzneibücher sich bis heute auf die Bestimmung des Gesamtalkaloidgehalts beschränkt, wird die Chinarinde für die Chininfabriken ausschließlich nach ihrem Chiningehalt bewertet.

Von den zahlreichen Verfahren, die im Laufe der Zeit erarbeitet wurden, hat die Internationale Standardmethode[93)55)] größere Bedeutung erlangt. Hiernach werden Chinin und Cinchonidin aus einem Rindenextrakt als Tartrate gefällt und das Verhältnis Chinin : Cinchonidin anschließend polarimetrisch ermittelt. Der Drehungswinkel wird anhand einer Tabelle auf die vorhandene Menge an Chinin- und Cinchonidinbase umgerechnet. Diese Methode geht auf einen Vorschlag von Hesse[36)] und Oudemans jr.[66)] zurück und wurde erstmals von Commelin 1912 veröffentlicht[13)]. Bis heute, also noch nach etwa 100 Jahren, ist sie die allein verbindliche Analysenmethode, nach der sich der Handelsverkehr zwischen den Plantagen und den Chininfabrikanten richtet[93) 55)].

2.2. Neuere Bestimmungsmethoden.

In einer sehr ausführlichen Arbeit befaßten sich vor 25 Jahren Eder und Ruckstuhl mit dem Problem einer quantitativen Chininbestimmung[21)]. Ihre Methode gliedert sich in 4 Abschnitte:

a) Bestimmung des Gesamtalkaloidgehalts nach Wojahn und Erdelmeier (Pharmacop.Helv.V)[102)]. Die Alkaloide werden mit 0,1 n-Salzsäure gegen Methylrot titriert.

b) Bestimmung der Summe Chinin + Hydrochinin + Cinchonidin + Hydrocinchonidin durch eine Variation der Tartratmethode.

c) Bestimmung der Summe Chinin + Hydrochinin durch Methoxylgruppenbestimmung nach Zeisel, mod. nach Vieböck und Schwappach[99]. Aus der Differenz zwischen b) und c) ergibt sich die Summe von Cinchonidin + Hydrocinchonidin.

d) Bestimmung des Hydrochiningehalts durch Oxidation des Chinins zu Chitenin mit Hilfe von Permanganat, Ausschütteln des unveränderten Hydrochinins aus ammoniakalischer Lösung mit Äther und anschließende acidimetrische Titration.

In neuerer Zeit wurden von Reche[82] sowie von Krummel[52] zwei Methoden zur Chininbestimmung aus Chinarinden vorgeschlagen. Das Verfahren von Reche besteht im wesentlichen aus einer Kombination zwischen der Fällung des Chinins als schwerlösliches Chromat und als Sulfat. Die Alkaloide werden nach dem Vorschlag von Wojahn und Erdelmeier[102] extrahiert und das Chinin zuerst aus schwefelsaurer Lösung durch Neutralisation mit Ammoniak als Sulfat gefällt. Das Chininsulfat wird anschließend in Essigsäure gelöst und mit Kaliumchromat zu Chininchromat umgefällt. Zur Abtrennung evtl. mitgerissener Drogenbegleitstoffe wird der Niederschlag in Methanol gelöst und über basisches Aluminiumoxid adsorptiv filtriert. Dabei wird das Chromat zerlegt und im Filtrat läßt sich die freie Base acidimetrisch bestimmen.

Krummel arbeitete eine Variante der bekannten Sulfatfällung des Chinins aus. Er versuchte den Nachteil der

Mitausfällung von Hydrochininsulfat durch jodometrische Titration des Sulfat-Niederschlags zu umgehen. Die Extraktion der Alkaloide erfolgt wie bei Reche (s.o.). Die extrahierten Alkaloidbasen werden dann über neutrales Aluminiumoxid filtriert, um Farbstoffe und Drogenbegleitstoffe abzutrennen und anschließend der Gesamtalkaloidgehalt durch Titration mit 0,1 n-Schwefelsäure bestimmt. Die austitrierte, mit Schwefelsäure wieder angesäuerte, Lösung wird mit Ammoniak auf pH 6,7 gestellt. Das ausgefallene Chininsulfat wird abgesaugt, mit Bromlösung versetzt und das nicht verbrauchte Brom zurücktitriert. Aus dem Bromverbrauch läßt sich der Chiningehalt berechnen.

2.3. Nachteile der Bestimmungsmethoden.

Bei der Tartratmethode (Internationale Standardmethode) von Oudemans jr.[66] bzw. Commelin[13] werden Hydrochinin- und Hydrocinchonidintartrat mitausgefällt. Oudemans selbst stellte fest, daß man leicht zuviel Chinintartrat findet, da auch der Drehungswinkel nicht streng konzentrationsabhängig ist. Braeckman, Severen und Jaeger van Moeseke[11] untersuchten die Tartratmethode an reinen Alkaloidgemischen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und stellten fest, daß die Fällung des Chinins in hohem Maße konzentrationsabhängig ist, besonders dann, wenn wenig oder überhaupt kein Cinchonidin vorhanden ist; dazu enthält der Niederschlag wechselnde Mengen Chinidin. Auch bei Tartratnieder-

schlägen aus der Droge konnten die Autoren diese Beobachtungen im wesentlichen bestätigen. Fraglich ist die in der Originalvorschrift der Standardmethode geforderte Löslichkeitskorrektur für gelöste Tartrate, wenn man bedenkt, daß die Löslichkeitsangaben für Chinintartrat bei verschiedenen Autoren mehr oder weniger stark variieren[6) 46)]. Ebenso ist die Ermittlung der optischen Drehung in einer durch Drogenbegleitstoffe gelb gefärbten Tartratlösung sehr problematisch. Bereits Hesse[38)] bemerkt, daß durch die gelbe Farbe der Tartratlösung nur eine approximative Bestimmung des Drehungswinkels möglich sei und dadurch die Genauigkeit der Resultate Gefahr laufe. Schon ein Ablesefehler von 0,1 ° (6′) macht sich im Endergebnis immerhin zu 4 - 10 % relativ bemerkbar. Schließlich können die Tabellenwerte für den Chinin- und Cinchonidingehalt, aus Modellanalysen mit reinem Chinin- und Cinchonidintartrat ermittelt, auch nicht ohne weiteres auf die aus der Rinde erhaltenen, gelb gefärbten Tartrate übertragen werden (Hesse)[38)]. Die Tabelle selbst wird endlich fragwürdig, wenn man sieht, daß von Oudemans[66)] und Hesse[40)], später auch von Kerner und Weller[49)], unterschiedliche Zahlenverhältnisse angegeben werden. Unklarheiten bestehen weiterhin über den Kristallwassergehalt der Tartrate, die möglicherweise für die unterschiedliche Berechnung der Tabellenwerte mitverantwortlich sind[39)].

Die Tartratmethode wurde verschiedentlich variiert. Aber auch Vorschläge, Chinin aus dem Tartratniederschlag als Herapathit ($3\ C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot H_2SO_4 + C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot HJ \cdot J_4 + 3\ H_2O$)

zu fällen oder mit Äther auszuschütteln, der mit Cinchonidin gesättigt ist, brachten keine grundsätzliche Verbesserung[85].

Ebenso ist das Verfahren von Eder und Ruckstuhl[21] unbefriedigend. Welche Fehler hiernach bei der Tartratfällung auftreten, wurde bereits dargestellt. Thron und Dirscherl[96] stellten fest, daß bei der Permanganat-Oxidation eines Gemisches von Vinyl- und Dihydrobase letztere in geringem Maße mitoxidiert wird. Im übrigen ist die Methode nach Eder und Ruckstuhl sehr aufwendig und zeitraubend. Als Vorteil läßt sich anführen, daß die Bestimmung des Chinin-, Cinchonidin- und Hydrochiningehalts bereits aus einer relativ geringen Drogenmenge von 1,25 g möglich ist.

Auch die Methoden von Reche[82] und Krummel[52] weisen Nachteile auf, die ihre Verwendbarkeit als Routineanalyse einschränken. So wird bei Reche das Hydrochininchromat mitgefällt, was Krummel nachweisen konnte. Daß bei hohem Cinchonidingehalt dieses, zumindest teilweise, in Form einer Doppelverbindung mit Chininchromat mitgefällt wird, wie bereits Hesse[39] feststellen konnte, ist nicht ausgeschlossen und wird von dem Autor nicht schlüssig widerlegt.

Die Anwesenheit von Hydrochinin im Chininsulfat-Niederschlag glaubt Krummel zwar mit Hilfe der Bromtitration erfassen zu können, muß aber selbst zugeben, daß die Bromtitration nicht übermäßig empfindlich ist.

Beide Verfahren liefern bei einem Chiningehalt unterhalb von 40 % im extrahierten Alkaloidgemisch keine zuver-

lässigen Ergebnisse mehr, eine Beobachtung, die schon von Hille gemacht wurde[41]. Auch wird die Reinheit der für die Beleganalysen verwendeten Alkaloidbasen, insbesondere die Abwesenheit von Hydrochinin im verwendeten Chinin, von beiden Autoren nicht schlüssig nachgewiesen. Bei der zur Reinigung durchgeführten Craig-Verteilung von Chininbase ergeben sich z.B. geringfügige Abweichungen zwischen experimentell ermitteltem und theoretischem Verlauf der Verteilungskurven, eine Tatsache, der von beiden Autoren keine Bedeutung beigelegt wird, die aber auf mangelhaften Reinheitsgrad hinweisen kann. Unvorteilhaft ist schließlich auch die hohe Drogenmenge von 5 g, die für eine Chininbestimmung eingesetzt werden muß.

3. Dünnschichtchromatographische Trennungsversuche der China-Alkaloide.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung des Chinins in Chinarinden geliefert werden.

Eine befriedigende Abtrennung des Chinins von Nebenalkaloiden und Drogenbegleitstoffen ist mit gravimetrischen Methoden offenbar nur teilweise möglich, wie bereits gezeigt wurde. Auf Schwierigkeiten stößt insbesondere der Nachweis, daß Chinin bei der Fällung vollständig erfaßt wird und der zur Wägung kommende Niederschlag definiert ist.

Die Zuverlässigkeit einer quantitativen Bestimmungsme-

thode zeigt sich aber gerade dann, wenn es gelingt, die Reinheit des Chinin-Niederschlags sicher nachzuweisen.

Die erste Aufgabe war daher, eine Trennungs- und Nachweismethode für Chinin und die wichtigsten Nebenalkaloide zu finden.

Große Erfolge in der Arzneimittelanalytik wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie erzielt. Auch für den Nachweis und die Identifizierung von China-Alkaloiden wurde dieses Verfahren von zahlreichen Autoren herangezogen. Die Vorteile dieser Technik - geringer Substanzverbrauch bei großer Nachweisschärfe - bewogen mich, auf dünnschichtchromatographischem Weg eine Trennung der China-Alkaloide zu versuchen.

3.1. Schmelzpunkte und UV - Spektren der Alkaloidbasen.

Zur Verfügung standen die Alkaloidbasen Chinin, Chinidin, Cinchonin, Cinchonidin, Hydrochinin und Hydrochinidin von den Firmen C.F. Boehringer und Söhne (Mannheim) und Th. Schuchardt (München). Die vorhandenen Basen wurden zuerst mehrfach umkristallisiert und ihre Reinheit anhand des Schmelzpunkts und der UV-Spektren geprüft (s. auch Teil 2, S. 111).

Von den umkristallisierten Basen wurden die Schmelzpunkte nach den im DAB 7 aufgeführten Verfahren, der Kapillarmethode und der Metallblockmethode, sowie auf dem Kofler-Mikroschmelzpunktapparat bestimmt. Die ermittelten Schmelzpunkte wurden mit Literaturangaben verglichen und sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Schmelzpunke der umkristallisierten Chinabasen

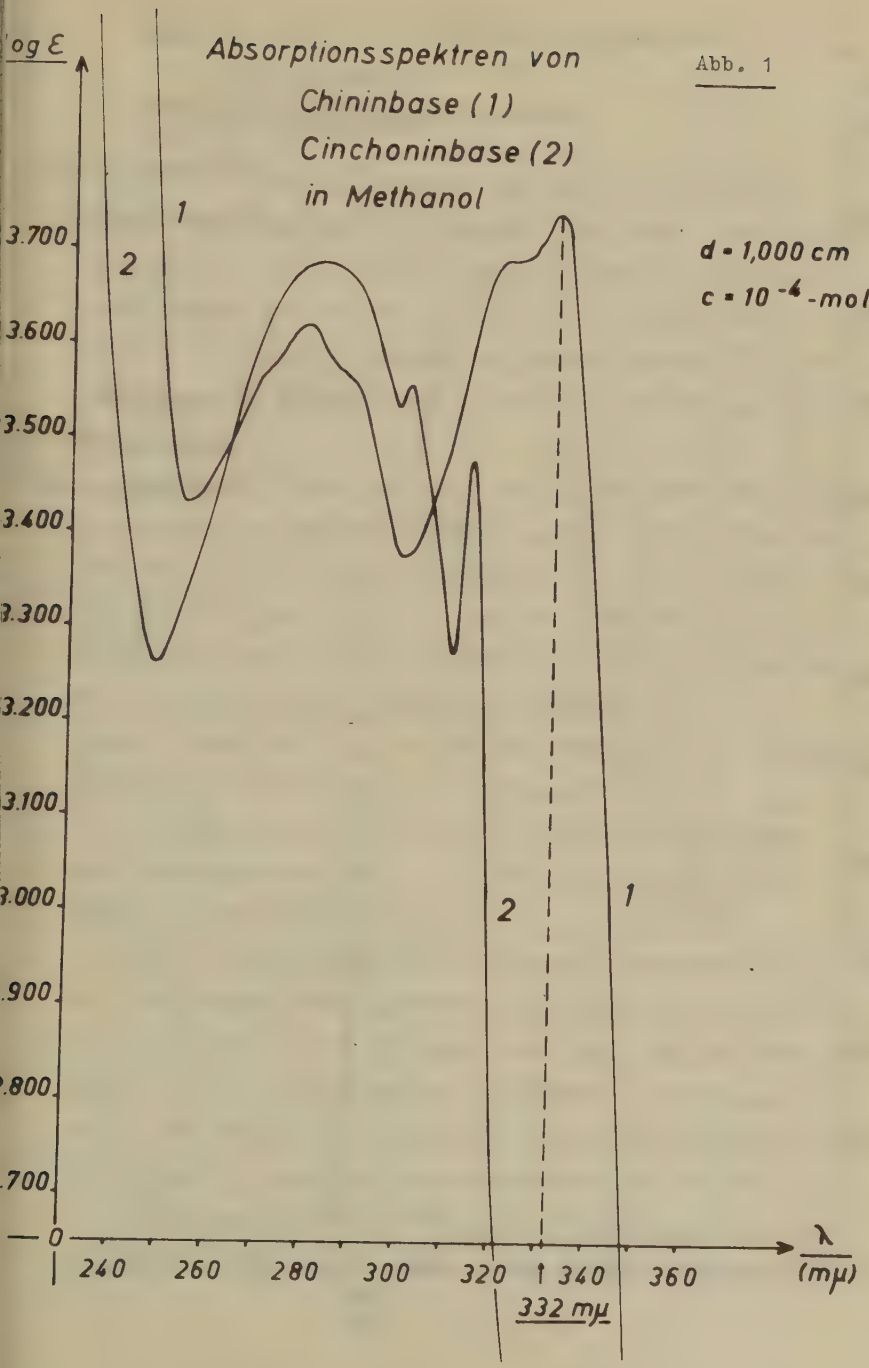
	eigene Ergebnisse			Literaturangaben				
	Kapillar-methode	Metall-block	Schmelzpkt.mikroskop nach Kofler	Beilstein 4.Auflage Band XXIII	Kempf und Kutter: Schmelzpunkttab.	Kofler: Thermomikromethoden	Stimson/ Reuter: J.Amer.chem. Soc.68,1946	Utermark/ Schicke: Schmelzpunkttab.
Chinin	174°-175°	174,2° unkorr.	175,5° unkorr.	174,4°-175° wasserfrei aus Alkoh.	172,8° (174,5°-75°; 177°)	176° Eutektikum mit Benzanilid 142°	174,5°	175°
Chinidin	172°-172,5°	172,4° unkorr.	174,5° unkorr.	174°-175°; 172,5° wasserfrei	171,5° k	171° Eutektikum mit Benzanilid 140°	173°	172,5°
Cinchonin	253°-256° (Substanz verkohlt)	263,8° unkorr.	261,5° unkorr.	260° unkorr. 268,8° k 264,3°	264,3° k	264° Eutektikum mit Dicyandiamid 206°	263° (Bad auf 255° vorgeheizt)	268,8° korr 260,0° unk.
Cinchonidin	202°-203°	208,6° unkorr.	210,0° unkorr.	202,4° 201-203° 205-206° 207,2° k	207° k	204° Eutektikum mit Dicyandiamid 193°	205,5°	202°-203°
Dihydrochinin	----	173°-176°	(150°-160°)	172,3°	172,3° k	165°-175° Eutektikum mit Benzanilid 153°	171,5°	172°
Dihydrochinidin	172°	171,4° unkorr.	172,0° unkorr.	166°-167° 168° unkorr.	-----	-----	168,4°	-----

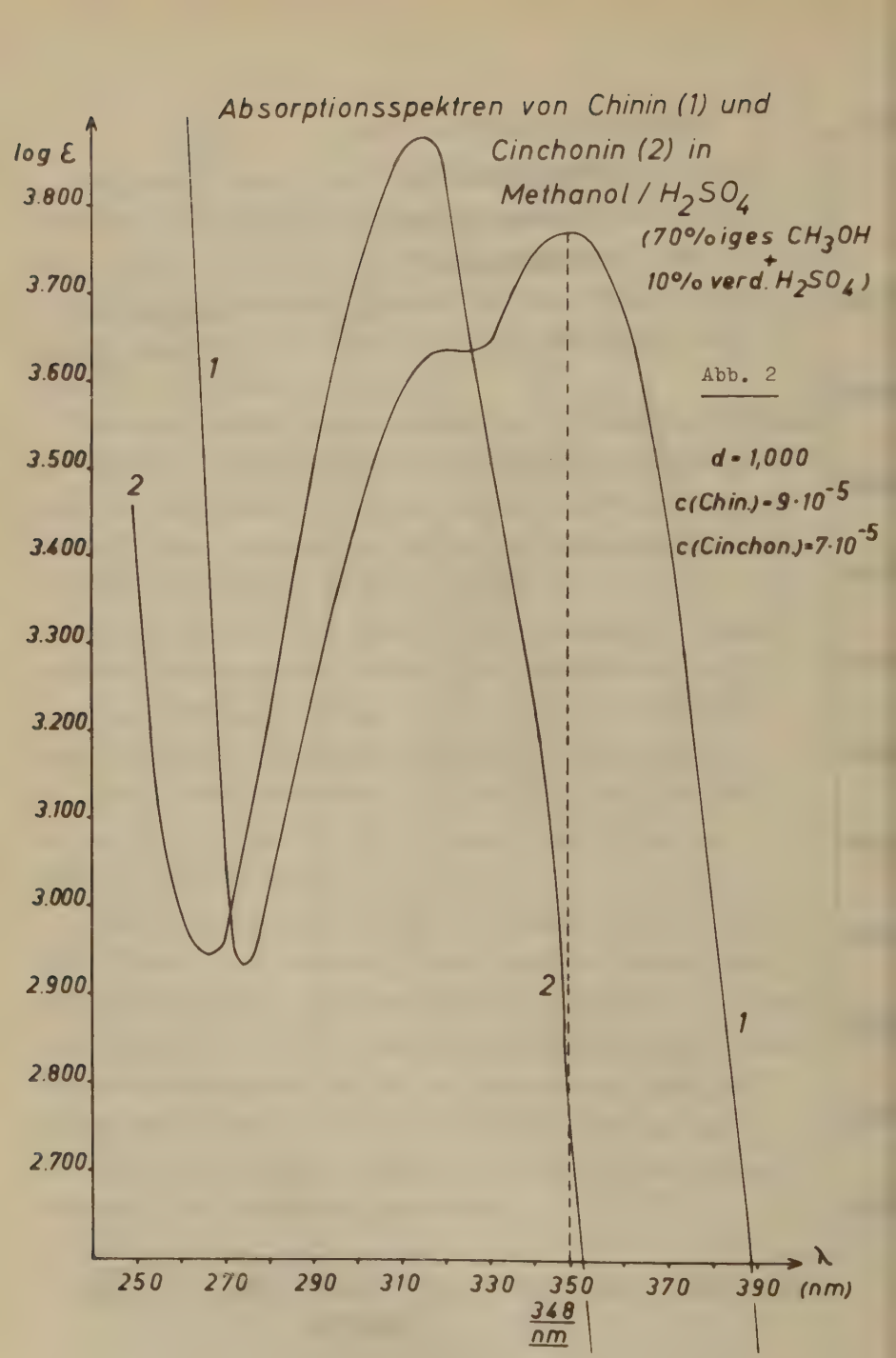
Die Tabelle zeigt, daß die Schmelzintervalle von Chinin, Chinidin, Hydrochinin und Hydrochinidin recht nahe beieinander liegen und sich von einem zum andern Gerät sogar überschneiden. Die Schmelzpunktsangabe als Reinheitskriterium besitzt bei diesen Substanzen daher nur Aussagekraft bei gleichzeitiger Angabe des Geräts.

Übereinstimmende Absorptionsspektren in neutraler (Methanol) und in saurer Lösung (Methanol/Schwefelsäure) haben Chinin, Chinidin, Hydrochinin und Hydrochinidin. Eine Verunreinigung dieser 4 Basen untereinander ist auf UV - spektroskopischem Weg nicht feststellbar (s. Abb.1 und 2).

Das gleiche gilt für Cinchonin und Cinchonidin (ebenso auch für Dihydrocinchonin und Dihydrocinchonidin,die mir nicht zur Verfügung standen; s. aber Stimson und Reuter[92]). Der Einfluß der auxochromen Methoxylgruppe zeigt sich in der bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 283 nm bei Cinchonin (316 nm im sauren) nach 332 nm bei Chinin (348 nm im sauren).

Spektralphotometrisch lassen sich daher lediglich die methoxylhaltigen Chinabasen (Chinin, Chinidin, Hydrochinin und Hydrochinidin) von den methoxylfreien (Cinchonin, Cinchonidin, Hydrocinchonin und Hydrocinchonidin) unterscheiden durch Messung der Extinktion bei 332 nm in neutraler Lösung. Im sauren Medium sind die Unterscheidungsmöglichkeiten ungünstiger, da im Absorptionsmaximum des Chinins bei 348 nm Cinchonin noch geringfügig absorbiert.


log ε
Absorptionsspektren von
Chininbase (1)
Cinchoninbase (2)
in Methanol
Abb. 1
d = 1,000 cm
c = 10⁻⁴-molar
3.700
3.600
3.500
3.400
3.300
3.200
3.100
3.000
2.900
2.800
2.700
0
1
2
240
260
280
300
320
340
360
λ
(mμ)
332 mμ


Absorptionsspektren von Chinin (1) und
Cinchonin (2) in
Methanol / H_2SO_4
(70%iges CH_3OH
10% verd. H_2SO_4)
Abb. 2
d = 1,000
c(Chin.) = $9 \cdot 10^{-5}$
c(Cinchon.) = $7 \cdot 10^{-5}$
log ε
3.800
3.700
3.600
3.500
3.400
3.300
3.200
3.100
3.000
2.900
2.800
2.700
1
2
λ
250
270
290
310
330
350
370
390
(nm)
348
nm

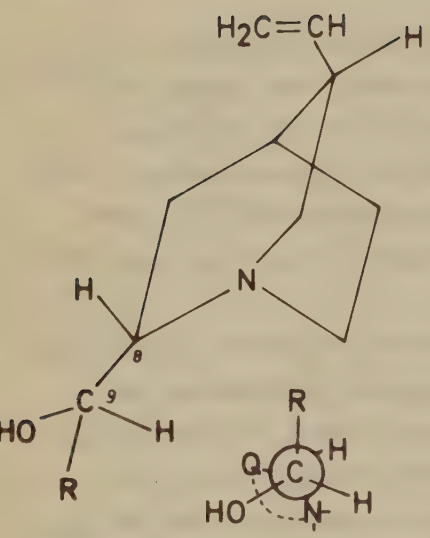
3.2. Konfiguration der China-Alkaloide.

Bevor ich auf die Versuche zur dünnschichtchromatographischen Trennung der einzelnen Basen näher eingehe, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die räumlichen Isomerieverhältnisse der China-Alkaloide gegeben werden; diese sind vor allem von Rabe und seiner Schule[78-80], sowie von Prelog und Mitarbeitern[60] aufgeklärt worden (s. auch Roth)[84].

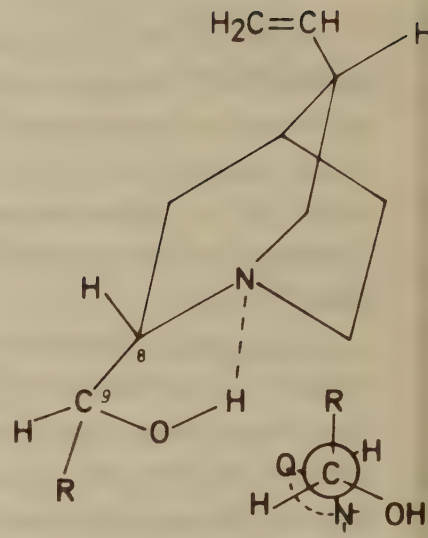
Bei allen China-Alkaloiden ist die Konfiguration durch Isomerie an den Kohlenstoffatomen C_8 und C_9 festgelegt; an den beiden andern Asymmetriezentren C_3 und C_4 ist die Konfiguration in allen Fällen die gleiche. Hierdurch ist bei den methoxylhaltigen und den methoxylfreien Basen die Zahl der möglichen Isomere auf jeweils 4 beschränkt:
Chinin, Chinidin, Epichinin und Epichinidin, sowie Cinchonin, Cinchonidin, Epicinchonin und Epicinchonidin.

Die Epibasen spielen gegenüber den Normalbasen eine sehr untergeordnete Rolle; ihr Gehalt in der Rinde ist äußerst niedrig (etwa 1 %).

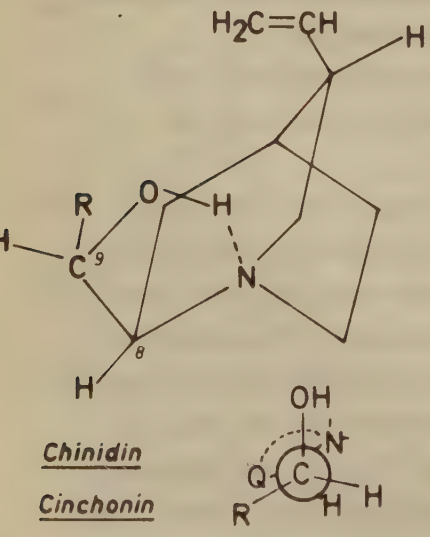
Wie die Formelbilder auf S. 26 zeigen, besitzen Chinin und Cinchonidin übereinstimmende Konformation, ebenso Chinidin und Cinchonin. Die Epibasen haben an C_8 gleiche Konfiguration wie die entsprechenden Normalbasen, entgegengesetzte an C_9. Bei Chinin und Cinchonidin (Epichinin und Epicinchonidin) steht C_9 äquatorial zum Chinuklidinring und damit in exo - Stellung zur Vinylgruppe, bei Chinidin und Cinchonin (Epichinidin und Epicinchonin) axial und damit in endo - Stel-



Chinin, Cinchonidin

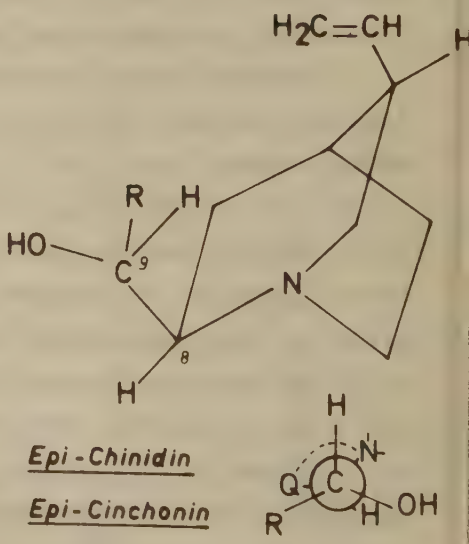


Epi-Chinin, Epi-Cinchonidin



Chinidin

Cinchonin



Epi-Chinidin

Epi-Cinchonin

lung zur Vinylgruppe. Für die Hydrobasen Hydrochinin und Hydrochinidin gilt entsprechendes wie für die Vinylbasen. Betrachtet man die C_8- C_9 - bindung als Drehungsachse, dann sind die Normalbasen (ebenso die entsprechenden Dihydrobasen) erythroständig, die Epibasen threoständig, wie sich mit Hilfe der Newmanschen Projektionsformeln am besten verdeutlichen läßt (s. auch Prelog und Häfliger)[76].

Nach Untersuchungen von Roth[84] sowie von Auterhoff und Kalpathy[4] besteht durch Nachbarschaft ("cis - Stellung") der Hydroxylgruppe zum Chinuklidin-Stickstoff bei Chinidin und Cinchonin, sowie bei Epichinin und Epicinchonidin die Möglichkeit der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Hierdurch ist zu verstehen, daß Chinin und Cinchonidin in Wasser und polaren Solventien löslicher sind als Chinidin und Cinchonin. Auch das chromatographische Verhalten der einzelnen Basen weist in gleiche Richtung. Mit unpolaren Fließmitteln erreichen Chinidin und Cinchonin die höchsten Rf-Werte auf Kieselgel, mit polaren Fließmitteln wandert Chinin höher als Cinchonin.

Rabe[78-80], sowie Prelog und Mitarbeiter[76) 77] stellten fest, daß die normalen China-Alkaloide schwächer basisch sind als die entsprechenden Epi-Isomeren. Sie folgerten daraus, daß eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Hydroxylgruppe am C_9 und Chinuklidin-Stickstoff bei allen Normalbasen vorhanden sei. Diese Untersuchungen scheinen im Gegensatz zu den Beobachtungen von Roth und von Auterhoff und Kalpathy zu stehen, nach deren Ansicht auch im Epichinin eine solche Wasserstoffbrücke vorliegt, OH - gruppe und N_1

also "cis-ständig" sind, nicht dagegen im Chinin und Cinchonidin.

Die scheinbar widersprechenden Befunde lassen sich dann in befriedigender Weise deuten, wenn man annimmt, daß verschiedene Konstellationen in unterschiedlichen Reaktionsmedien vorliegen, wie auch Auterhoff und Kalpathy vermuten. Sicherlich spielt auch Raumerfüllung und Wechselwirkung der Methoxyl- und der Vinyl- bzw. Äthylgruppe (bei den Dihydrobasen) eine Rolle und muß bei der Beurteilung der physikalisch-chemischen Eigenschaften berücksichtigt werden.

Ein weiterer Gesichtspunkt ergibt sich daraus, daß die Festigkeit der Wasserstoffbrücke im Chinidin und Cinchonin nicht sehr groß sein kann, da Resonanzstabilisierung fehlt; die Festigkeit der Bindung steht zwischen der von echten Chelaten und der von intermolekularen Brückenbindungen und wird schon beim Lösen und Verdünnen mit unpolaren Lösungsmitteln gesprengt.

Nach Prelog und Häfliger[76] ist bei den Vinylbasen sogar Ätherbindung zwischen OH - gruppe am C_9 und C_{10} der Vinylgruppe möglich.

3.3. Dünnschichtchromatographie der Chinabasen auf Kieselgel G.

Bevorzugtes Adsorbens für die Dünnschichtchromatographie der China-Alkaloide ist Kieselgel G. Es zeichnet sich aus durch relative Unempfindlichkeit gegenüber Luftfeuchtigkeit[25], hohe Aktivität[63] und schließlich durch hohe Auf-

nahmekapazität[100]. Zahlreiche Versuche zur dünnschichtchromatographischen Trennung der China-Alkaloide sind bereits beschrieben worden [48) 62) 65) 87) 90) 95) 98) 100)]. Eine vollständige Trennung des Chinins von seinen Nebenalkaloiden scheint gleichwohl nicht gelungen zu sein.

In eigenen Versuchen mit den Alkaloidbasen Chinin, Chinidin, Cinchonin, Cinchonidin, Hydrochinin und Hydrochinidin zeigte sich, daß die bisher verwendeten Fließmittel sich in 2 Gruppen, gemäß ihrem Trennungsverhalten, einteilen lassen.

Gruppe 1: Fließmittel unpolaren Charakters :

Die hierher gehörigen Entwicklerflüssigkeiten sind überwiegend hydrophob und haben eine niedrige Dielektrizitätskonstante. Alle Laufmittel enthalten eine organische Base in geringer Konzentration (Diäthylamin), um die sauren Gruppen des Kieselgels zu binden und dadurch die Alkaloidbasen zur Entwicklung zu bringen. Die Trennungen sind sowohl auf nichtimprägnierten wie auch auf alkalisch imprägnierten Kieselgelplatten möglich und zeigen folgende Merkmale:

a) Chinin und Hydrochinin haben den kleinsten Rf-Wert;
b) Cinchonin hat den größten Rf-Wert;
c) die Vinylbasen lassen sich von den zugehörigen Dihydroverbindungen nicht trennen.

Eine Erklärung für den Trennungsmechanismus läßt sich möglicherweise in der unterschiedlichen Adsorptionsaffinität der einzelnen Alkaloidbasen zum Trägermaterial finden. Die Rf-Werte entsprechen den Konfigurationsverhältnissen.

Hydrochinin und Hydrochinidin, die in ihrer Konstellation mit den analogen Vinylbasen übereinstimmen, haben auch gleiche Rf-Werte wie diese und sind von den Vinylbasen nicht abzutrennen. Chinin ist die polarste Base und hat zusammen mit Hydrochinin den niedrigsten Rf-Wert. In Übereinstimmung mit den Gesetzmäßigkeiten der klassischen Adsorptionschromatographie an der Säule sind die chromatographierten Substanzen hydrophober als die stationäre Phase, aber hydrophiler als das Elutionsmittel[63] (s. Abb. 3).

Gruppe 2: Fließmittel polaren Charakters:

Hierher gehören Entwicklerflüssigkeiten mit hydrophilen Eigenschaften und einer hohen Dielektrizitätskonstanten. Für die Trennungen sind alkalisch imprägnierte Kieselgelplatten am geeignetsten. Charakteristisch sind folgende Trennungsmerkmale:

a) Chinin und Chinidin haben den größten Rf-Wert; beide Isomeren lassen sich nicht trennen;
b) Die Hydrobasen haben die niedrigsten Rf-Werte;
c) Die Vinylbasen werden deutlich von den Dihydrobasen getrennt.

Die Trennungen kommen wahrscheinlich durch verteilungschromatographische Mechanismen zustande. Konfigurationsunterschiede spielen hierbei eine untergeordnete Rolle, während von der Molekülgröße abhängige Löslichkeitsunterschiede stärker in Erscheinung treten (s. Abb. 4).

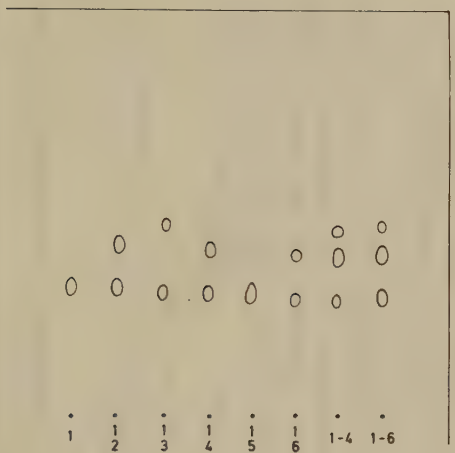


Abb. 3:

Kieselgel G

Kerosin : Aceton :
Diäthylamin = 23 : 9 : 9

1 = Chinin
2 = Chinidin
3 = Cinchonin
4 = Cinchonidin
5 = Hydrochinin
6 = Hydrochinidin

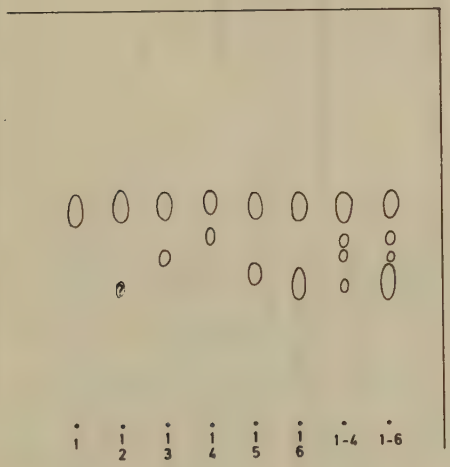


Abb. 4:

Kieselgel G alkalisch

Methyläthylketon :
Methanol : Wasser =
3 : 1 : 0,5

1 = Chinin
2 = Chinidin
3 = Cinchonin
4 = Cinchonidin
5 = Hydrochinin
6 = Hydrochinidin

Tab. 2: Beispiele für unpolare Fließmittel

Nr.	Fließmittel	Rf - Werte					
		Chinin	Chinidin	Cinchonin	Cinchonidin	Hydrochinin	Hydrochinidin
1	Chloroform : Aceton : Diäthylamin = 5 : 4 : 1	0,27	0,37	0,43	0,40	0,27	0,37
2	Benzol : Äthylacetat : Diäthylamin = 7 : 2 : 1	0,08	0,16	0,24	0,15	0,08	0,16
3	Chloroform : Diäthylamin = 9 : 1	0,09	0,17	0,24	0,17	0,09	0,16
4	Cyclohexan : Chloroform : Diäthylamin = 5 : 4 : 1	0,05	0,09	0,15	0,10	0,05	0,08
5	Cyclohexan : Diäthylamin = 9 : 1	0,02	0,03	0,05	0,04	0,02	0,03
6	Kerosin : Aceton : Diäthylamin = 23 : 9 : 9	0,30	0,41	0,46	0,40	0,30	0,41
7	Isopropanol : Benzol : Diäthylamin = 2 : 4 : 1	0,50	0,65	0,69	0,62	0,50	0,64
8	Benzol : Äther : Diäthylamin = 20 : 12 : 5	0,18	0,30	0,38	0,29	0,18	0,29
9	Cyclohexanol : Cyclohexan : Hexan = 1 : 1 : 1 + 5 % Diäthylamin	0,40	0,59	0,62	0,53	0,40	0,58

Tab. 3: Beispiele für polare Fließmittel

Nr.	Fließmittel	Rf - Werte					
		Chinin	Chinidin	Cinchonin	Cinchonidin	Hydrochinin	Hydrochinidin
1	Chloroform : Äthylacetat : Methanol = 1 : 1 : 1	0,42	0,42	0,27	0,33	0,28	0,28
2	Chloroform : Methanol : Diäthylamin= 80 : 20 : 1 (0,2)	0,55	0,55	0,45	0,52	0,52	0,53
3	Methyläthylketon : Methanol : Wasser = 3 : 1 : 0,5	0,53	0,53	0,40	0,46	0,36	0,34
4	Benzol : Methanol = 8 : 2 (6 : 4)	0,62	0,62	0,50	0,50	0,59	0,59

Die Eigenart, daß mit unpolaren Fließmitteln eine Trennung der Stereoisomeren, nicht aber eine Trennung von Vinyl- und Dihydrobasen möglich ist, während mit polaren Entwicklern wohl die Vinyl- von den Dihydrobasen, nicht aber die Stereoisomeren getrennt werden, legte nahe, die vollständige Auftrennung aller 6 Chinabasen durch eine Kombination der Fließmittel aus Gruppe 1 und 2 in der Technik der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie zu versuchen.

Bereits van Severen[87], sowie Kamp und Mitarbeiter[48] hatten zweidimensional chromatographiert. Die Fließmittel dieser Autoren waren aber nur schlecht verwertbar, da sie sich auf der Platte entmischten.

Dagegen konnte mit der in der nachstehenden Abb. 5 angegebenen Kombination der beiden Fließmittelsysteme

a) Methyläthylketon : Methanol : Wasser = 3 : 1 : 0,5

b) Isopropanol : Benzol : Diäthylamin = 2 : 4 : 1

eine gute Auftrennung aller 6 Alkaloidbasen erhalten werden.

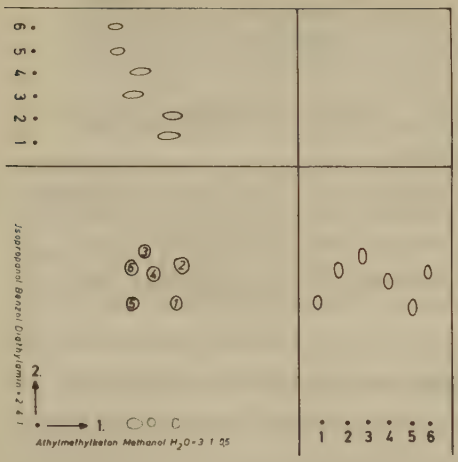


Abb. 5:

Kieselgel alkalisch

1 = Chinin

2 = Chinidin

3 = Cinchonin

4 = Cinchonidin

5 = Hydrochinin

6 = Hydrochinidin

4. Quantitative Dünnschichtchromatographie der China-Alkaloide.

Hinsichtlich der Qualitätskontrolle von Arzneibuchdrogen ist eine quantitative Chininbestimmung von besonderem Interesse. Mit der qualitativ dünnschichtchromatographisch geglückten Trennung der China-Alkaloide auf Kieselgel G "Merck" eröffnete sich die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung. Hierzu bereits entwickelte Verfahren lassen sich einteilen in :

a) Direktauswertung der Substanzen auf der Sorbensschicht durch visuellen Fleckenvergleich, Planimetrie, Densitometrie, Reflexdensitometrie, Fluoreszenzmessung auf der Platte oder Remissionsmessung.

b) Elution der Flecken vom Trägermaterial und anschließende photometrische, fluorimetrische, polarographische, und in Sonderfällen sogar volumetrische oder gravimetrische Bestimmung.

Während für Direktauswertungen ein relativ großer und spezieller Geräteaufwand erforderlich ist, lassen sich Bestimmungen nach Elution der Substanzen von der Schicht auch mit herkömmlichen Methoden ausführen. Die Elution der Chininzone von der Trägerschicht mit nachfolgender photometrischer oder fluorimetrischer Messung erschien daher als geeignete Methode zur Bestimmung des Chinins.

Wie die Abb. 1 und 2 zeigen, läßt sich in methanolischer Lösung eine photometrische Chininbestimmung in Gegenwart von Alkaloidbasen des "Cinchonintyps" sehr gut durchführen, da diese beim Hauptmaximum des Chinins nicht mehr absorbieren. Es muß also lediglich auf Abwesenheit der andern methoxylhaltigen Basen geachtet werden.

4.1. Bisherige Versuche zur quantitativ dünnschichtchromatographischen Bestimmung von China-Alkaloiden.

Auf dem Gebiet der China-Alkaloide wurden quantitativ dünnschichtchromatographische Bestimmungen bisher von Müller und Honerlagen, Oswald und Flück und Ragazzi und Veronese versucht.

Müller und Honerlagen[62] trennten die China-Alkaloide mit einem unpolaren Fließmittel der Gruppe 1 (Tab.2, Fließmittel Nr.6) auf. Ihr Versuch, Drogenextrakte zu chromatographieren, die Chininzonen zu eluieren und fluorimetrisch zu bestimmen, mißlang jedoch, da sich Chinin nicht quantitativ eluieren ließ. Statt dessen bestimmten die Autoren die Summe von Chinin + Chinidin (und Hydrochinin + Hydrochinidin) fluorimetrisch direkt aus dem Drogenauszug in schwefelsaurer Lösung, da dies die einzigen fluoreszierenden Alkaloide sind. Fluoreszenzlöschende Begleitstoffe ließen sich mit Perlonpulver entfernen.

Oswald und Flück[65] führten quantitativ dünnschichtchromatographische Bestimmungen an verschiedenen Solanaceendrogen durch. Die Bestimmungen erfolgten durch planimetrische Messung der Fleckengröße. Auf die gleiche Art wurden auch die 4 Hauptalkaloide der Chinarinde Chinin, Chinidin, Cinchonin und Cinchonidin bestimmt. Die Streuungsbreite betrug nach Angabe der Autoren für Solanaceen-Alkaloide $\pm$ 5,8 %, für China-Alkaloide $\pm$ 8,0 %.

Ragazzi und Veronese[81] schließlich beschrieben die quantitative Bestimmung von Hydrastin, Reserpin und Chinin

durch Fluoreszenzmessung nach Chromatographie an hydratisiertem Magnesiumoxid. Elution der Flecken war hierbei nicht notwendig, da sich Magnesiumoxid leicht in Schwefelsäure löst, und diese Lösung direkt zur Fluoreszenzmessung verwendet werden konnte.

Die planimetrische Messung der Fleckenflächen, wie sie Oswald und Flück[65)] ausführten, ist mit vielen Unsicherheitsfaktoren behaftet; dies kommt auch in der großen Schwankungsbreite der Reproduzierbarkeit zum Ausdruck. Der Streubereich von $\pm$ 8,0 %, den die Autoren angeben, ist relativ hoch. Außerdem läßt sich, entgegen den Angaben der Autoren, mit den von ihnen erwähnten Fließmitteln (s. Tab. 2, Fließmittel Nr. 7 und 8) keine Trennung des Chinins von Hydrochinin erzielen.

4.2. "Umkehrentwicklung" zur Abtrennung des Chinins für quantitative Bestimmungen.

Die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie im herkömmlichen Maßstab hat im Hinblick auf eine quantitative Auswertung große Nachteile. Einmal ist die Laufstrecke in beiden Dimensionen relativ kurz, was sich ungünstig auf den Trenneffekt auswirkt. Der Rf-Wert einer Substanz wird ja von vielen Faktoren beeinflußt, u.a. von der Laufstrecke, dem Feuchtigkeitsgehalt der Trägerschicht und bis zu gewissem Grade auch von der aufgetragenen Substanzmenge. Bei kleinen Rf-Wert-Unterschieden, kurzer Laufstrecke und

größerer Auftragsmenge, wie für quantitative Bestimmungen erforderlich, kann - bei schwankendem Feuchtigkeitsgehalt der Schicht - eine vollständige Trennung der fraglichen Substanzen bereits schwierig oder gar unmöglich werden. Hinzu kommt bei größeren Auftragsmengen die Gefahr der "Schwanzbildung", die sich ebenfalls negativ auf den Trenneffekt auswirkt. Das Vorliegen verschiedener Trennungsmechanismen für beide Chromatographierichtungen wie im vorliegenden Fall bringt einen zusätzlichen Unsicherheitsfaktor.

Andererseits ist auch die Identifizierung der getrennten Substanzen mit Hilfe von Leitchromatogrammen schwierig und keineswegs immer eindeutig, wie auch die Abb. 5 erkennen läßt. Bei Chromatographie größerer Substanzkonzentrationen im Hauptchromatogramm wird die Auffindung entsprechender Substanzen mit Hilfe der Leitchromatogramme bereits problematisch, wenn nur kleine Rf-Wert-Unterschiede vorliegen.

Aufgrund der Trennungseigenschaften der Fließmittel aus Gruppe 1 und 2 (polare und unpolare Fließmittel) können sich die aufgezeigten Nachteile herkömmlicher zweidimensionaler Entwicklung umgehen lassen durch Chromatographie in e i n e r Dimension, aber in entgegengesetzten Richtungen, wobei für eine Richtung Fließmittel der Gruppe 1, für die zweite Richtung Fließmittel der Gruppe 2 eingesetzt werden. Chinin hat ja nach Chromatographie mit polaren Entwicklerflüssigkeiten den größten Rf-Wert zusammen mit Chinidin, mit unpolaren Laufmitteln den kleinsten Rf-Wert gemeinsam mit Hydrochinin. Daher ist zu erwarten, daß nach einer Entwicklung mit polaren

Solventien durch erneute Chromatographie mit unpolaren Laufmitteln von der Fließmittelfront nach dem Start hin eine vollständige Abtrennung des Chinins von allen Nebenalkaloiden erzielt wird. Brauchbare Trennungen können nach diesem Verfahren nur mit Laufmitteln erwartet werden, die hohe Rf-Werte bringen. Um diesen Effekt zu verstärken, ist es möglich, in beiden Richtungen bis zum Plattenrand zu entwickeln nach dem Prinzip der Durchlaufchromatographie, d.h. die Platte wird erst dann dem Fließmitteltrog entnommen, wenn sie gleichmäßig durchfeuchtet ist. Bei Fließmittelgemischen findet in der Regel Frontalanalyse statt, d.h. es bildet sich ein Konzentrationsgradient der mobilen Phase auf der Oberfläche des Trägers aus. Bei einer üblichen Trennstrecke von 10 cm erreicht daher der polarste Anteil des Entwicklergemisches,seiner hohen Kapillaraktivität zufolge, zuerst die Front; dadurch läßt sich aber nur ungenau feststellen, wann das Laufmittelgemisch vollständig die Front erreicht hat. Bei Durchlaufentwicklung spielt der Zeitpunkt der Entnahme der Platten aus dem Fließmitteltrog keine Rolle, da, wenn die Dünnschichtplatte gleichmäßig durchfeuchtet ist, keine Veränderung der Rf-Werte mehr stattfinden kann (dies gilt nur unter der Voraussetzung, daß mit Kammersättigung gearbeitet wird). Bei Trennungsversuchen nach dem "Umkehrverfahren" wurde bewußt auf eine gute Abtrennung des Chinins hingearbeitet, d.h. es wurden Entwickler gewählt, die große Unterschiede in den Rf-Werten zwischen Chinin und Chinidin bzw. zwischen Chinin und Hydrochinin gewährleisteten. Auf Aktivierung der Dünnschichtplatten wurde, wie bei allen

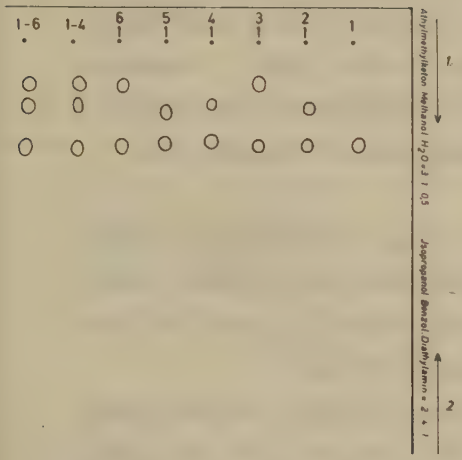


Abb. 6:

Kieselgel G alkalisch

1 = Chinin

2 = Chinidin

3 = Cinchonin

4 = Cinchonidin

5 = Hydrochinin

6 = Hydrochinidin

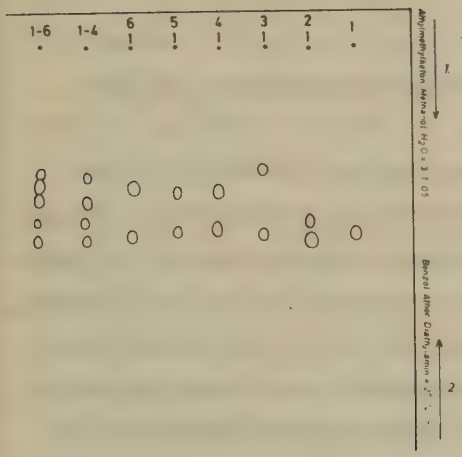


Abb. 7:

Kieselgel G alkalisch

1 = Chinin

2 = Chinidin

3 = Cinchonin

4 = Cinchonidin

5 = Hydrochinin

6 = Hydrochinidin

vorherigen Chromatogrammen, verzichtet. Verwendet wurden alkalische Kieselgelplatten. Daß sich Chinin nach dieser Methodik trennen läßt, zeigen die Abb. 6 und 7. Gegenüber der üblichen zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie ergeben sich mit diesem "Umkehrprinzip" folgende Vorteile:

a) Größerer Fleckenabstand, da eine größere Trennstrecke infolge Durchlaufchromatographie zur Verfügung steht.
b) Gleichmäßige Feuchtigkeitsaufnahme der ganzen Schicht und damit größere Konstanz der Rf-Werte.
c) Leitchromatogramme zur Identifizierung der Substanzen sind überflüssig. Stets muß ja Chinin unter den gewählten Bedingungen vom Start her gesehen die größere Strecke durchwandert haben.

Die auf den Abb. 6 und 7 gezeigten Trennungen des Chinins nach der "Umkehrtechnik" wurden auf Kieselgel G durchgeführt. Für quantitative photometrische Bestimmungen ist das besonders gereinigte Kieselgel HR "Merck" geeigneter, das sich durch niedrige und weitgehend konstante Blindwerte, insbesondere im UV-Bereich, auszeichnet. Interessanterweise unterscheidet sich nun das chromatographische Verhalten von Kieselgel HR geringfügig von dem des Kieselgel G. Wie Abb. 8 zeigt, konnte aber auch auf Kieselgel HR durch Variation des Fließmittelsystems mit der "Umkehrtechnik" eine brauchbare Abtrennung des Chinins von den übrigen Nebenalkaloiden erhalten werden. Bei Abb. 8 wurde Chinin in einer Größenordnung aufgetragen, die ungefähr der für quantitative Bestimmungen erforderlichen Menge entspricht.

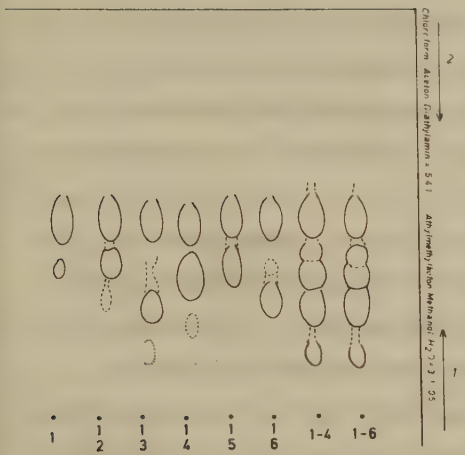


Abb. 8:

Kieselgel HR alkalisch

1 = Chinin

2 = Chinidin

3 = Cinchonin

4 = Cinchonidin

5 = Hydrochinin

6 = Hydrochinidin

4.3. Elution der Flecken über Mikrochromatographiesäulen.

Üblicherweise wird die Elution des Trägermaterials in Schliffstopfen-Reagenzgläsern durch Ausschütteln mit polaren Solventien, z.B. Methanol, durchgeführt. Das Kieselgel wird abzentrifugiert, das Eluat abgegossen, evtl. in geeigneter Weise verdünnt, und die Konzentration der betreffenden Substanz direkt, z.B. photometrisch, gemessen.

Hierbei können Verluste auftreten durch unvollständiges Abgießen des Eluats. Die Dauer des Ausschüttelns ist häufig unzureichend. Darüberhinaus enthält das Eluat trotz Zentrifugierens feinste Sorbenspartikelchen, die eine photometrische

Bestimmung stören; diese Gefahr ist bei Trägermaterialien wie Kieselgel besonders groß. Filtration des Eluats ist andererseits wieder ungünstig, da Verluste durch Adsorption am Papierfilter entstehen, Membranfilter, wie sie Spencer und Beggs[88] vorschlagen, schwierig zu beschaffen sind.

In Anlehnung an einen Vorschlag von Lehmann, Hahn und Martinod[56], die die quantitative Bestimmung verschiedener Lebensmittelfarbstoffe nach Chromatographie auf Zelluloseschichten untersuchten, ließen sich die geschilderten Schwierigkeiten umgehen. Die Autoren füllten das abgeschabte Schichtmaterial in eine englumige Glasröhre mit kapillarem Auslauf und eluierten den adsorbierten Farbstoff mit einem bestimmten Volumen 70-proz. Methanols. Durch den stetigen Zulauf von frischem Elutionsmittel wird das in der Mikrochromatographiesäule sich ausbildende Verteilungsgleichgewicht zwischen adsorbierter Substanz einerseits und gelöster andererseits laufend zugunsten der letzteren verschoben. Die Substanz wird somit "vollständiger" vom Sorbens abgelöst als dies durch Ausschütteln geschehen kann, bei dem sich ein statisches Gleichgewicht einstellt.

Die Autoren geben die Reproduzierbarkeit von quantitativen Bestimmungen durch photometrische Messung nach Elution über die Mikrosäule mit $\pm$ 1,3 bis $\pm$ 2,7 % relativ an bei Chromatographie auf Zelluloseschichten. Sollen Kieselgelschichten eluiert werden, ist es nach Angaben von Lehmann, Hahn und Martinod zweckmäßiger, in die Glasröhre zuerst eine 2 - 3 mm hohe vorher mit Wasser angefeuchtete Zellulose-

schicht einzufüllen. Die Zellulose soll hierbei als Filter wirken und Kieselgelpartikelchen zurückhalten. Zum Abschaben der Sorptionsschicht von der Glasplatte benutzten Lehmann und Mitarbeiter einen Objektträger in Form eines Rechtecks; hierdurch läßt sich die Schicht in einem Zuge verlustlos ablösen. Durch Druckelution kann der Durchfluß gegebenenfalls beschleunigt werden.

Aus den angeführten Gründen erschien die Anwendung dieser Technik vorteilhaft. 9 - 10 ml Elutionsmittel waren in der Regel ausreichend, um Chinin von der Sorbensschicht zu verdrängen, wie auch Lehmann und Mitarbeiter bei ihren Versuchen (Farbstoffelution von Zelluloseschichten) angeben; Anwendung von Druck war nicht erforderlich. Die Durchflußzeit betrug durchschnittlich 2 - 5 Stunden. Um die Beladungskapazität der Platte zu erhöhen, wurde bei allen quantitativen Bestimmungen auf 0,5 mm dicken Schichten gearbeitet.

4.4. Wahl des geeigneten Elutionsmittels.

Um zu prüfen, ob und inwieweit Chinin mit dieser Technik quantitativ eluierbar ist, wurde auf alkalischen Kieselgel HR - Platten, Schichtdicke 0,5 mm, mit einer Mikrometer-Dosierspritze steigende Mengen einer Chininlösung in Chloroform aufgetragen. Nach Umkehrentwicklung mit der auf Abb. 8 angegebenen Fließmittelkombination wurden die Flecken unter der UV-Lampe markiert, mit einem Objektträger abgeschabt und mittels Pergamentpapier in die Mikroröhren nach Lehmann

und Mitarbeitern eingefüllt. Der Auslauf war vorher mit einem Wattepfropfen verschlossen worden, auf den eine 2 - 3 mm hohe Schicht von leicht angefeuchtetem Zellulosepulver zur Dünnschichtchromatographie geschichtet war. Eluiert wurde mit 9 ml 70-proz., wäßrigem Methanol und der Durchfluß direkt in 10,0 ml - Meßkölbchen aufgefangen. Unter gleichen Bedingungen wurde eine Kieselgel-Blindprobe gemessen. Die zugehörige Konzentration wurde an einer Eichkurve abgelesen, die vorher mit präparativ schichtchromatographisch gereinigtem Chinin (Reinigung s.S.122) in 70-proz. Methanol aufgestellt worden war.

Der Streubereich der wiedergefundenen Chininmenge war ziemlich groß und lag bei $\pm$ 13 % des theoretischen Wertes. Die Meßlösungen waren durch feinste Partikelchen verunreinigt, die Filterwirkung der Zellulose somit unzureichend. Lichtstreuung an den Kieselgel- oder Zelluloseteilchen der Extinktionslösungen ist eine mögliche Ursache für die hohen Überwerte. Eine Filtration des Eluats durch Blaubandfilter erwies sich als völlig ungeeignet: Die gemessenen Chininwerte fielen auf 60 - 70 % des theoretischen Wertes, die Adsorptionswirkung des Filters ist mithin außerordentlich groß. Eine Reihe verschiedener Filterhilfsmittel wurde erprobt. Am besten war Linterspulver 124 (Macherey und Nagel) zur Säulenchromatographie geeignet, die Trübungsstoffe zurückzuhalten, die Lösungen blieben klar. Der Streubereich der gemessenen Werte lag mit -0,3 % bis -10 % aber immer noch sehr hoch. Adsorptionsverluste durch das Filterhilfsmittel in der Mikrosäule erschienen ausgeschlossen. Der

Grund konnte vielmehr in der ungenügenden Elution durch das bisher verwendete 70-proz. Methanol liegen. Eine Polaritätserhöhung im Sinne einer weiteren Verdünnung des Methanol konnte keine Vorteile bringen, da hierdurch die Löslichkeit des Chinins vermindert wurde. Auch durch Elution mit Methanol + 10 % verdünnte Schwefelsäure ließ sich keine Verbesserung erreichen, ebensowenig durch Verwendung von Methanol + 30 % Dimethylformamid. Beide Elutionsmittel lieferten Werte, die bis zu 10 - 20 % höher als die aufgetragene Konzentration lagen; auch die Blindwerte lagen bei diesen Lösungsmittelgemischen sehr hoch.

Zufriedenstellende Ergebnisse wurden schließlich mit ammoniakalischem Methanol erhalten. Am günstigsten war das Elutionsmittel Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.). Die Abweichung von der Eichkurve ließ sich hiermit im Durchschnitt auf -4 % max. erniedrigen. Daß Methanol/Ammoniak zu einer optimalen Elution des Chinins führt, läßt sich auch chromatographisch an der Erhöhung der Rf-Werte zeigen, die ja ein direktes Maß dafür sind, inwieweit ein Fließmittel in der Lage ist, eine Substanz aus ihrer adsorptiven Bindung an das Sorbens zu verdrängen. In Abb. 9 wurde Chininbase mit einer Reihe von Eluentien auf Kieselgel G chromatographiert. Die stärkste Elutionswirkung besitzen hiernach Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.) > Methanol + 10 % Ammoniak (10-proz.) > Methanol + 3 % verdünnte Schwefelsäure + 20 % Dimethylformamid > Methanol + 30 % Dimethylformamid.

Abb. 9

10% Et3N
0,1 n-H2SO4
70% CH3OH
70% CH3OH/H2O
DMF/H2O
DMF/H2O + 0,1% H2SO4 p.a.
DMF/H2O + 0,1% H2SO4 p.a.
DMF/H2O + 0,2% H2SO4
DMF/H2O + 10% Et3N
DMF/H2O + 10% Et3N/10% H2O
DMF/H2O + 25% CH3OH/12% H2O
DMF/H2O + 25% CH3OH/12% H2O
DMF/H2O + 2,2% H2SO4

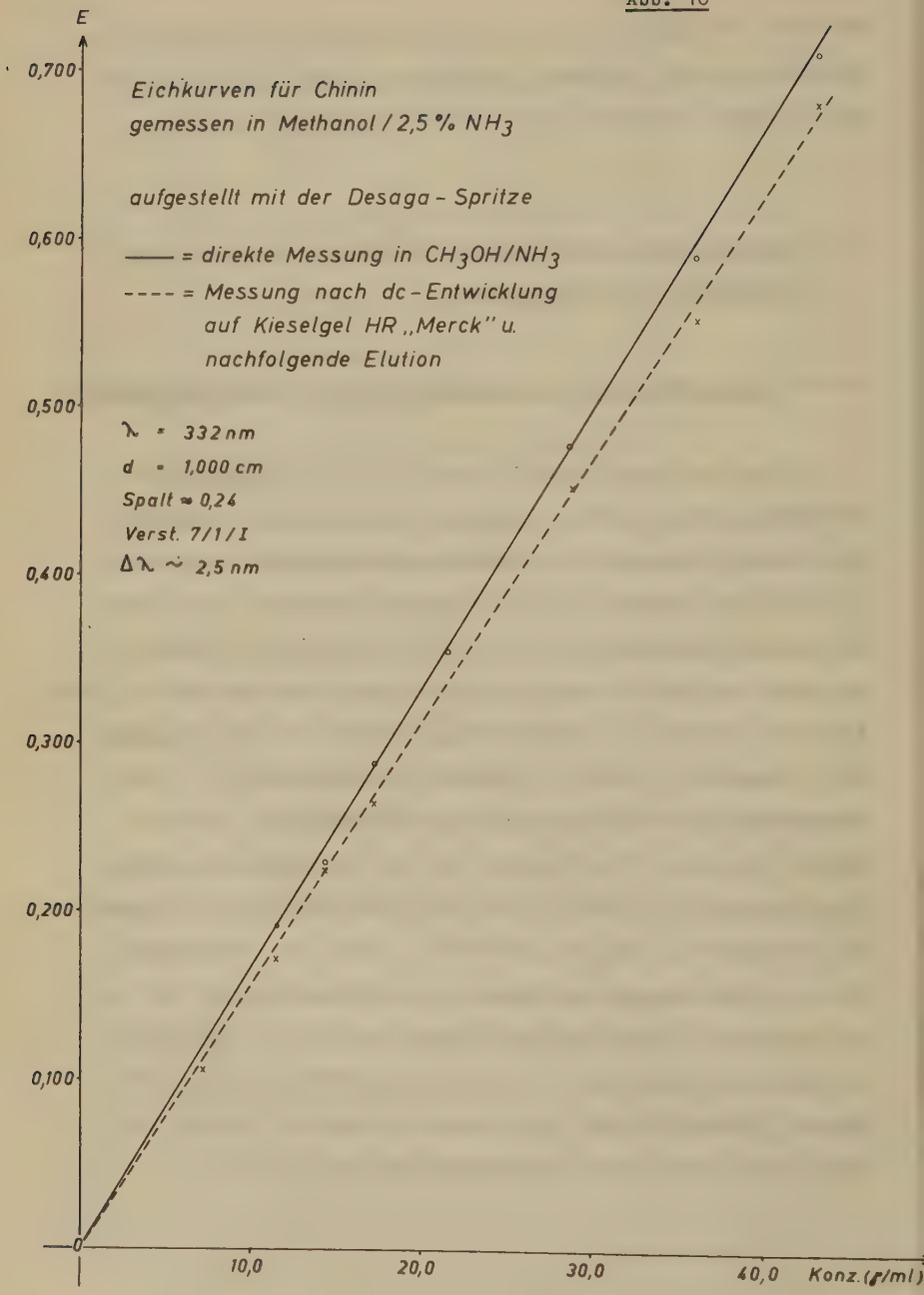
Wäßriges Methanol hat erstaunlicherweise nur eine sehr geringe eluierende Wirkung, geringfügig besser ist diejenige von 70-proz. Methanol + 10 % verdünnte Schwefelsäure.

4.5. Statistische Auswertung der Eichkurve für die photometrische Chininbestimmung.

4.5.1. Eichkurve ohne chromatographische Elution des Chinins.

Zur Aufstellung einer Eichkurve für die quantitative Chininbestimmung wurden steigende Mengen einer Lösung von Chininbase (präparativ schichtchromatographisch gereinigt s. S.122) in Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.) mit einer Mikrometer-Dosierspritze in 10,00 ml Meßkölbchen eingefüllt, zur Marke aufgefüllt und die Extinktion gegen Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.) im Spektralphotometer bei 332 nm gemessen. Insgesamt wurden 64 Messungen durchgeführt in 8 verschiedenen Konzentrationsbereichen (8 Messungen pro Eichpunkt). Aus den Extinktionswerten der verschiedenen Konzentrationsbereiche wurden die Mittelwerte gebildet und daraus die Eichkurve graphisch aufgestellt (Abb. 10, ausgezogene Kurve). Die nähere Bestimmung der Eichfunktion $y = bx + a$, des Anstiegs b sowie des Ordinatenabschnitts a ließ sich mit Hilfe der Regressions- oder Ausgleichsrechnung durchführen. Hierbei werden alle Meßwerte zugrunde gelegt, wodurch eine sehr genaue Bestimmung möglich ist[19) 28)].

Abb. 10


E
0,700
0,600
0,500
0,400
0,300
0,200
0,100
0
Eichkurven für Chinin
gemessen in Methanol / 2,5 % NH_3
aufgestellt mit der Desaga - Spritze
—— = direkte Messung in CH_3OH/NH_3
---- = Messung nach dc - Entwicklung
auf Kieselgel HR „Merck" u.
nachfolgende Elution
λ = 332 nm
d = 1,000 cm
Spalt ≈ 0,24
Verst. 7/1/I
Δλ ~ 2,5 nm
10,0
20,0
30,0
40,0
Konz. (γ/ml)

Die graphische Ermittlung aus den Eichwerten führt häufig zu Ungenauigkeiten infolge Streuung der Kurvenpunkte. Auch lassen sich aufgetretene Meßfehler, die die Eichkurve verfälschen können, durch die graphische Ermittlung nicht nachweisen.

Aus den Mittelwerten der gemessenen Extinktionen und den entsprechenden Konzentrationsbereichen ergaben sich 8 Wertepaare, die nun rechnerisch gegeneinander ausgeglichen wurden. (Rechnungsgang s. Teil 2 S.168)

Tab. 4: Eichfunktion mit Hilfe der Regressionsrechnung ermittelt

Koeff. der Eichfunktion	Betrag und Streubereich
b	0,01641 ± 0,00034
a	- 0,0023 ± 0,0086
Eichfunktion	y = 0,01641 x ± 0,00034

Tab. 4 zeigt, daß der errechnete Ordinatenabschnitt praktisch 0 beträgt, die Eichgerade mithin durch den Nullpunkt des Koordinatensystems geht, da der Streubereich höher liegt als der errechnete Wert, wodurch Beträge zwischen + 0,0063 und - 0,0109 möglich sind.

Eine statistisch gesicherte Aussage über die Linearität Eichkurve und damit über die Erfüllung des Lambert-Beer'schen Gesetzes im untersuchten Konzentrationsbereich läßt sich mit Hilfe der Korrelationsrechnung machen.

Der Korrelationskoeffizient r gibt Auskunft darüber, ob zwischen zwei Größen x und y überhaupt ein funktioneller Zusammenhang besteht[19) 28)]. Im vorliegenden Fall war eine lineare Korrelation zu erwarten. Der Wert für r wurde mit

$$r = + 0{,}9997877$$

errechnet. r muß stets auf seine Abweichung von 0 geprüft werden. Es ergab sich

$$t = 118{,}855$$

Dieser Betrag wird mit einem Tabellenwert t (P,n) verglichen, der von der statistischen Sicherheit P und der Zahl der Freiheitsgrade n abhängig ist[18) 19)].

$$t\ (P = 95\ \%,\ n = 6) = 2{,}447$$

$$t\ (P = 99\ \%,\ n = 6) = 3{,}707$$

Somit ist $t \gg t\ (P,n)$. Der lineare Zusammenhang zwischen der Auftragskonzentration x und der Extinktion y ist also sehr stark gesichert, das Lambert-Beer'sche Gesetz innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereichs streng erfüllt.

Zusätzlich wurde noch mit dem χ^2 - Test auf Vergleichbarkeit der Standardabweichungen der Einzelmessungen geprüft. Vergleichbar sind danach die Einzelmessungen nur dann, wenn der Wert von χ^2 kleiner ist als ein tabellierter Wert, der wieder von der statistischen Sicherheit P und der Zahl der Freiheitsgrade n abhängig ist[18) 19)]. Es wurden errechnet

$$\chi^2 = 12{,}534$$

Tabellenwert χ^2 (P = 95 %, n = 7) = 14,067

χ^2 (P = 99 %, n = 7) = 18,475

χ^2 ist kleiner als χ^2 (P,n), die Standardabweichungen und damit die Zufallsfehler innerhalb der Meßserien waren also vergleichbar.

4.5.2. Eichkurve nach chromatographischer Elution des Chinins.

Um den Einfluß der Dünnschichtchromatographie auf die aufgetragene Konzentration zu untersuchen, wurden mit der Mikrometer-Dosierspritze steigende Mengen einer Chininlösung in Chloroform auf alkalische Kieselgelplatten HR, Schichtdicke 0,5 mm, aufgetragen. Nach Umkehrentwicklung in der oben beschriebenen Fließmittelkombination wurden die Flecken unter der UV-Lampe markiert, mit einem Objektträger abgeschabt und mittels Pergamentpapier in die Mikrochromatographieröhren eingefüllt. Das Chinin wurde mit 9,0 ml Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.) eluiert, das Eluat im

10,00 ml Meßkölbchen zur Marke aufgefüllt und im Spektralphotometer bei 332 nm die Extinktion gegen eine in gleicher Weise behandelte Kieselgel-Blindprobe gemessen.

Auch hier wurden insgesamt 64 Bestimmungen durchgeführt in 8 verschiedenen Konzentrationsbereichen. Aus den erhaltenen Extinktionswerten wurden die Mittelwerte gebildet und die wiedergefundene Konzentration mit der oben aufgestellten Eichkurve verglichen.

Die mittlere gemessene Konzentration betrug 92,23 % mit einem Streubereich von $\Delta x = \pm 5{,}47$ % rel. und einem Vertrauensbereich der Mittelwerte von $\Delta \bar{x} = \pm 1{,}93$ % rel. Die mittlere gemessene Konzentration ist identisch mit dem systematischen Fehler des Verfahrens.

Die χ^2 - Prüfung ergab, daß die Einzelmessungen vergleichbar waren. Gefunden wurde

$$\chi^2 = 6{,}892$$

Tab.wert χ^2 (P = 95 %, n = 7) = 14,067

Tab.wert χ^2 (P = 99 %, n = 7) = 18,475

Der systematische Fehler des Verfahrens läßt sich nun eliminieren durch Bestimmung der Eichfunktion aus den Meßwerten, die nach der Chromatographie erhalten worden waren. Die Korrelationsrechnung zeigte einen streng linearen Zusammenhang der Meßwerte und somit Geradlinigkeit der Eichkurve.

Folgende Werte wurden erhalten:

$$r = 0{,}9996541$$

$$t = 93{,}104$$

$t\ (P = 95\ \%,\ n = 6) = 2{,}447$

$t\ (P = 99\ \%,\ n = 6) = 3{,}707$

$t \gg t\ (P,n)$.

Anstieg und Ordinatenabschnitt der Eichgeraden wurden mit der Regressionsrechnung ermittelt (Tab. 5). Auch hier läßt sich der Ordinatenabschnitt a = 0 setzen, da dieser aufgrund des Streubereichs zwischen y = + 0,0024 und y = - 0,0184 schwankt.

Tab. 5: Eichfunktion der Eichgeraden nach dünnschichtchromatographischer Elution durch Regressionsrechnung ermittelt

Koeff. der Eichfunktion	Betrag und Streubereich
b	0,01571 ± 0,00041
a	- 0,0080 ± 0,0104
Eichfunktion y =	0,01571 x ± 0,00041

4.5.3. Vergleich zwischen beiden Eichkurven.

Eine Übersicht über die Streuung und damit den Zufallsfehler der Meßwerte ohne und nach Dünnschichtchromatographie vermittelt Tab. 6.

Tab. 6: Streuung der Meßwerte ohne und nach Dünnschichtchromatographie

Meßwerte ohne Chromatographie		Meßwerte nach Chromatographie	
s_1	$= \pm 0{,}00455$	s_2	$= \pm 0{,}00446$
s_1 relat.	$= \pm 1{,}24\ \%$	s_2 relat.	$= \pm 1{,}29\ \%$
Δx_1	$= \pm 0{,}01048$	Δx_2	$= \pm 0{,}01029$
Δx_1 relat.	$= \pm 2{,}86\ \%$	Δx_2 relat.	$= \pm 2{,}98\ \%$
$\Delta \bar{x}_1$	$= \pm 0{,}00371$	$\Delta \bar{x}_2$	$= \pm 0{,}00364$
$\Delta \bar{x}_1$ relat.	$= \pm 1{,}01\ \%$	$\Delta \bar{x}_2$ relat.	$= \pm 1{,}05\ \%$

In den Streubereichen sind alle bei Aufstellung der jeweiligen Eichkurven möglicherweise aufgetretenen Fehler mitenthalten (Spritzenfehler, Abweichung der Meßkölbchen, Meßungenauigkeit usw.). Die Standardabweichung der Meßwerte

ohne Dünnschichtchromatographie ist größer als diejenige nach Chromatographie. Es mußte festgestellt werden, ob ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen diesen beiden Standardabweichungen besteht. Dies läßt sich mit Hilfe der F - Prüfung durchführen. Das Verhältnis der Varianzen wird hiernach mit einem Tabellenwert verglichen, der wieder abhängt von der geforderten statistischen Sicherheit und der mit beiden Standardabweichungen verknüften Zahl der Freiheitsgrade. Ein Unterschied ist nur dann gesichert, wenn F größer ist als $F\ (P,n_1,n_2)$ [18)19)20)28)47)]. Berechnet wurde

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{0{,}0000206727}{0{,}0000199273} = \underline{1{,}0374}$$

$$F\ (P = 95\ \%,\ n_1 = n_2 = 55) = 1{,}57$$

$$F\ (P = 99\ \%,\ n_1 = n_2 = 55) = 1{,}89$$

Es besteht daher kein statistisch gesicherter Unterschied zwischen beiden Standardabweichungen, die Differenz ist nur zufälliger Natur.

Die anschließende Überprüfung der quantitativen Dünnschichtchromatographie des Chinins in Gemischen mit Nebenalkaloiden zeigte, daß die Chinintrennung von Art und Menge der vorhandenen Nebenalkaloide nicht beeinflußt wird.

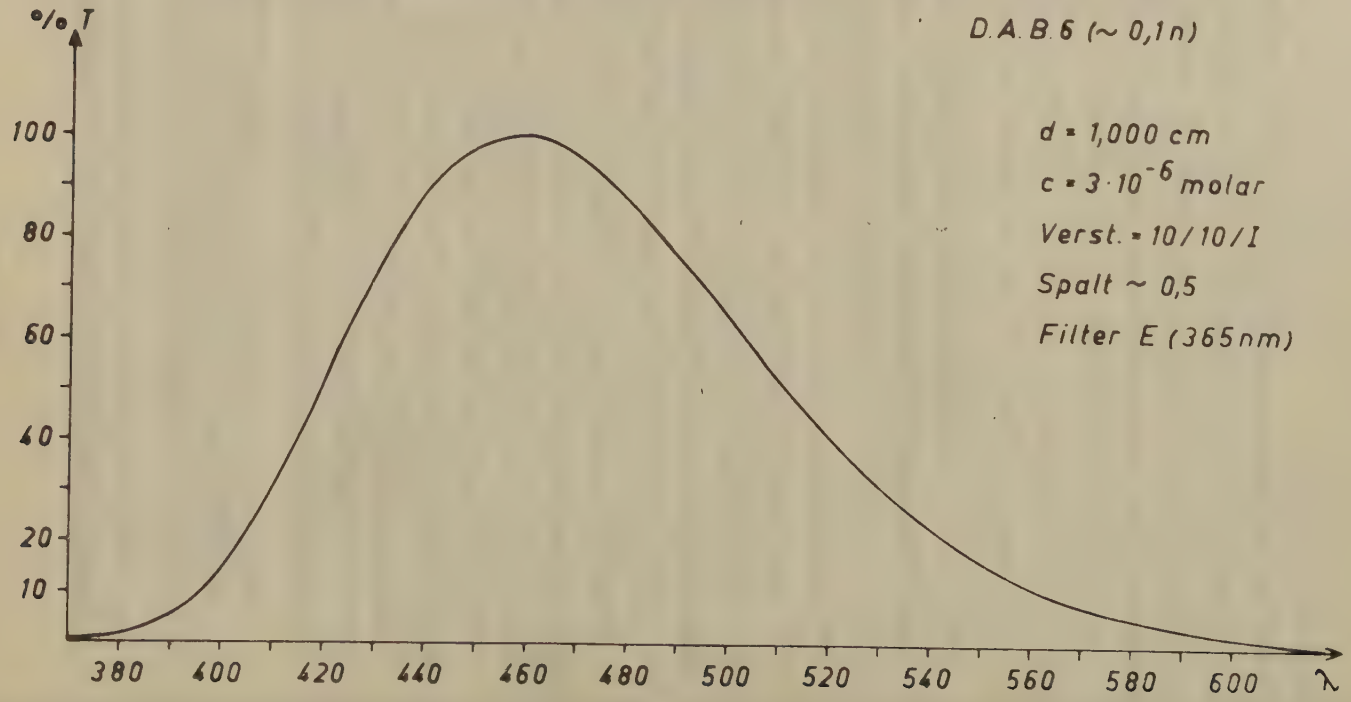
4.6. Fluorimetrische Chininbestimmung.

Zur quantitativen Bestimmung des Chinins können schließlich auch Fluoreszenzmessungen in schwefelsaurer Lösung herangezogen werden. Die Empfindlichkeit ist außerordentlich groß: Noch $4 \cdot 10^{-8}$ bis $4 \cdot 10^{-10}$ g/ml Chininsulfat lassen sich mit Hilfe der Fluoreszenz nachweisen[22]. Die Nachweisgrenze übertrifft somit diejenige durch Extinktionsmessung um 3 Zehnerpotenzen.

Eine quantitative Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt in der Regel durch Vergleich mit Eichstandards, da dem Meßlicht kein Vergleichslicht gegenübersteht wie in der Photometrie. Um gültige Aussagen über die Fluoreszenzintensität treffen zu können, muß die spektrale Quantenverteilung eines Standards bekannt sein. Von verschiedenen Autoren wurde mit geeichten Fluorimetern die spektrale Quantenverteilung von sekundären Strahlungsstandards genau vermessen[51) 59)]. Eine solche Eichung des Standards ist bei Fluoreszenzintensitätsvergleichen verschiedener spektraler Zusammensetzung wohl erforderlich, im vorliegenden Fall der Chininbestimmung gegen einen Vergleichsstandard von Chininsulfat erübrigte sich dies.

Von einer $3 \cdot 10^{-6}$ -molaren Lösung von Chininbase in 0,1 n-Schwefelsäure wurde das Fluoreszenzspektrum aufgenommen bei einer Anregungs-Wellenlänge von 365 nm. In Übereinstimmung mit Literaturangaben lag das Fluoreszenzmaximum bei 460 nm (Abb. 11). Anschließend wurde in verschiedenen

Abb. 11: Fluoreszenzspektrum von Chinin gemessen in CH_3OH / 3% H_2SO_4
D.A.B.6 (~ 0,1n)



Alkaloidgemischen der Chiningehalt nach dünnschichtchromatographischer Trennung und Elution fluorimetrisch gegen Vergleichsstandards von Chininsulfat gemessen. Als Elutionsflüssigkeit für das Kieselgel diente wie bei den Extinktionsmessungen Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.). Das Eluat wurde auf dem Wasserbad bis auf wenige ml eingeengt und mit 0,1 n-Schwefelsäure auf 10,00 ml aufgefüllt.

Der Streubereich der wiedergefundenen Konzentrationen lag mit ± 8 % höher als bei photometrischen Messungen. Diese Fehlerbreite ist auf Störfaktoren zurückzuführen, die mit der großen Empfindlichkeit der Chininfluoreszenz im Zusammenhang stehen; es wirken sich vor allem Einflüsse meßtechnischer Art ungünstig aus, so besonders Intensitätsschwankungen des Erregerlichts, sowie die spektrale Empfindlichkeitsverteilung des Meßgeräts. Ebenso bewirken geringe Verunreinigungen des Trägermaterials und der Elutionsflüssigkeit durch fluoreszierende Staubteilchen der Laborluft oder durch mit Aufhellern behandelte Zellulosefasern bereits eine starke Verfälschung der Meßergebnisse.

Auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse fluorimetrischer Messungen wurde daher verzichtet.

4.7. Quantitative Chininbestimmung aus Chinarinden.

4.7.1. Vergleich zwischen der quantitativen Dünnschichtchromatographie und der Internationalen Standardmethode.

Zur quantitativen Ermittlung des Chiningehalts aus Chinarinden standen 9 Drogenmuster zur Verfügung, die z.T. bereits von Reche[82] und Krummel[52] untersucht worden waren. Die Extraktion der Alkaloide wurde nach der im DAB 7 für die Gesamtalkaloidbestimmung der Chinarinde angegebenen Vorschrift ausgeführt, die auf einem Vorschlag von Wojahn und Erdelmeier[102] und unveröffentlichten Versuchen von H.Böhme und Mitarbeitern basiert. Das Rindenmaterial wird hiernach mit 25-proz. Ameisensäure in der Wärme aufgeschlossen, die Alkaloidbasen mit Natronlauge ausgefällt und in Äther/Chloroform aufgenommen. Ein aliquoter Teil der Äther/Chloroformphase wird zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 10,0 ml Äthanol aufgenommen. Diese Lösung wird nun über neutrales Aluminiumoxid filtriert und in dem Eluat anschließend mit 0,1 n-Salzsäure der Gesamtalkaloidgehalt ermittelt.

Für die Chininbestimmung wurde das Säuleneluat auf 10,00 ml aufgefüllt, und mit einer Mikrometer-Dosierspritze aliquote Teile hiervon auf alkalische Kieselgel HR -Platten, 0,5 mm Schichtdicke, aufgetragen. Chromatographie, Isolierung und Elution der Chininzonen geschah wie vorstehend mehrfach beschrieben. Aus den Extinktionsmessungen der Kieselgeleluate ergab sich der Chiningehalt, der unter Berücksichtigung des Auftragevolumens auf die eingesetzte Drogenmenge umgerechnet wurde.

In dem Aluminiumoxid-Filtrat wurde anschließend der Gesamtalkaloidgehalt nach dem DAB 7 bestimmt. Der für die Chininbestimmung verbrauchte Volumenanteil wurde bei der Gehaltsbestimmung entsprechend berücksichtigt.

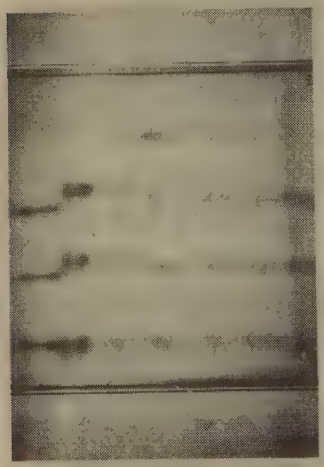


Abb. 12: Chinarinde, „Boehringer", Muster 1

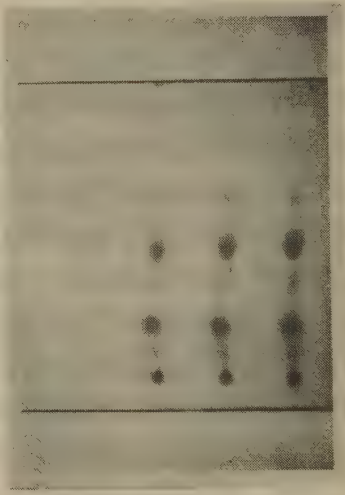


Abb. 13: Chinarinde, „Boehringer", Muster 2

Die Abb. 12 und 13 geben die Photographie der unter UV-Licht fluoreszierenden Chromatogramme zweier Drogenauszüge (Chinarinde "Boehringer", Muster 1 und Muster 2) nach Umkehrentwicklung in den auf S. 43 beschriebenen Fließmittelsystemen wieder. Gut erkennbar anhand der Vergleichssubstanz (Chininbase, Handelsware) ist der stark fluoreszierende Chininfleck. Bei den andern Flecken handelt es sich in der Hauptsache um Chinidin, Hydrochinin, sowie um Drogenbegleitstoffe, die im Unterschied zu den Chinabasen gelb fluoreszierten.

Von den Drogen wurden gleichzeitig Kontrollbestimmungen nach der Internationalen Standardmethode durchgeführt. Tab. 7 zeigt die nach beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse, denen die nach der Sulfat-Chromatmethode von Reche und die nach der Sulfat-Bromadditionsmethode von Krummel erhaltenen Werte zum Vergleich gegenübergestellt sind. Alle Gehaltsangaben beziehen sich auf die getrocknete Droge.

Z.T. stark abweichend, verglichen mit den von Krummel und Reche sowie den nach der Internationalen Standardmethode erhaltenen Werten, ist der quantitativ chromatographisch ermittelte Chiningehalt. Besonders auffallend ist dieser Unterschied bei den Drogen Nr. VIII und IX, die sich andererseits durch einen hohen Gesamtalkaloidgehalt auszeichnen. Die Abweichungen im Chiningehalt können durch methodische Fehler begründet sein. Einmal besteht die Möglichkeit, daß bei der quantitativ dünnschichtchromatographischen Chininbestimmung neben Chinin noch andere methoxylhaltige Nebenalkaloide erfaßt werden, die Chinintrennung somit unvollständig ist. Zum andern können die Abweichungen aber auch dadurch hervorgerufen werden, daß die Tartratfällungen unvollständig sind oder nicht den tabellarisch festgelegten Chinin/Cinchonidin-Verhältnissen entsprechen, eine Vermutung, die auch von Krummel in anderem Zusammenhang geäußert wird. Um die erste Möglichkeit nachzuprüfen, wurden von den fraglichen Drogenauszügen nach der Dünnschichtchromatographie die Chininzonen eluiert und erneut auf Kieselgel HR aufgetragen und entwickelt. In gleicher Weise wurden auch die Drogen Muster 1, Muster 2 und Muster 3 von "Boehringer" (Nr. V - VII) behandelt. Es zeigte sich,

Tab. 7: Chiningehalt von Chinarinden nach verschiedenen Methoden

Droge-Nr.	Bestimmungsmethode		Reche	Krummel	eig. Ergebnis (Mittelwert)
L. Cortex Chinae succir. DAB 6 ANZAG (1953)	Trocknungsverlust		6 %	8,7 %	8,64 %
	Gesamt-Alkaloidgehalt	Standardmethode	8,1-8,2 %	8,80-8,85 %	
		nach DAB 6	6,5 %	6,53 %	
		nach DAB 7			
	Chiningehalt	Standardmethode	1,42 %	1,48 - 1,63 %	
		Sulfat-Chromat-methode	1,70 - 1,82 %		
		Sulfat-Brom-additionsmeth.		2,58 - 2,63 %	
		Quantitative Chromatographie			2,08 %
II. Cortex Chinae succir. WOELM (VI,54)	Trocknungsverlust		6 %	8,6 %	8,41 %
	Gesamt-Alkaloidgehalt	Standardmethode	7,9 %	9,40 - 9,43 %	11,10 %
		nach DAB 6		7,94 %	
		nach DAB 7			10,10 %
	Chiningehalt	Standardmethode	1,65 %	1,49 - 1,67 %	1,31 %
		Sulfat-Chromat-methode	1,52 - 1,70 %		
		Sulfat-Brom-additionsmeth.		1,54 - 1,55 %	
		Quantitative Chromatographie			2,44 %
III. Cortex Chinae succir. San Thomé WOELM cont. 7,57% T. A. ; 2, 63% Chinin = 3, 55% Chinin Sulphat	Trocknungsverlust		9,5 %	9,0 %	8,83 %
	Gesamt-Alkaloidgehalt	Standardmethode	7,6 %	7,21 - 7,24 %	
		nach DAB 6		5,67 %	
		nach DAB 7			8,94 %
	Chiningehalt	Standardmethode	1,31 - 1,40 %	1,62 - 1,71 %	
		Sulfat-Chromat-methode	1,90 - 1,95 %		
		Sulfat-Brom-additionsmeth.		1,42 - 1,55 %	
		Quantitative Chromatographie			1,47 %

ab. 7 (Forts.)

roge-Nr.	Bestimmungsmethode		Reche	Krummel	eigene Ergebnisse
	Trocknungsverlust		8 %	7,8 %	7,09 %
'. Cortex inae iccir.)ELM .v. gross. 38 % TA. .69 % inin- lphat	Gesamt-Alkaloidgehalt	Standardmethode	7,3 %	3,53 – 3,62 %	
		nach DAB 6		2,74 %	
		nach DAB 7			3,78 %
	Chiningehalt	Standardmethode	1,17 %	0,67 – 0,78 %	
		Sulfat-Bromadditionsmeth.		0,54 – 0,58 %	
		Quantitative Chromatographie			1,08 %
China- rinde, mahlen, ehrin- r/Mann- im" ster 1	Trocknungsverlust			9,0 %	8,18 %
	Gesamt-Alkaloidgehalt	Standardmethode		8,22 – 8,25 %	9,01 %
		nach DAB 6		6,69 – 6,73 %	
		nach DAB 7			7,25 %
	Chiningehalt	Standardmethode		1,61 – 1,74 %	1,51 %
		Sulfat-Bromadditionsmeth.		1,38 – 1,49 %	
		Quantitative Chromatographie			2,14 %
. ina- nde, mahlen, ehrin- r/Mann- im" ster 2	Trocknungsverlust			9,1 %	8,56 %
	Gesamt-Alkaloidgehalt	Standardmethode		9,67 – 9,70 %	9,99 %
		nach DAB 6		8,54 – 8,59 %	
		nach DAB 7			8,99 %
	Chiningehalt	Standardmethode		7,28 – 7,35 %	6,94 %
		Sulfat-Bromadditionsmeth.		5,53 – 5,59 %	
		Quantitative Chromatographie			7,30 %

Tab. 7 (Forts.)

Droge-Nr.	Bestimmungsmethode		Krummel	eigene Ergebnisse
VII. Chinarinde, gemahlen, "Boehringer/Mannheim" Muster 3	Trocknungsverlust		10,9 %	8,82 %
	Gesamt-Alkaloid gehalt	Standardmethode	8,11 - 8,14 %	8,52 %
		nach DAB 6	6,85-6,95 %	
		nach DAB 7		7,66 %
	Chinin-gehalt	Standardmethode	6,13 - 6,22 %	5,17 %
		Sulfat-Brom-additionsmeth.	4,04 - 4,06 %	
		Quantitative Chromatographie		5,55 %
VIII. Cortex Chinae succir. conc. ANZAG vom 20.8.1959	Trocknungsverlust			8,10 %
	Gesamt-Alkaloid gehalt	Standardmethode		10,36 %
		nach DAB 7		11,83 %
	Chinin-gehalt	Standardmethode		0,91 %
		Quantitative Chromatographie		2,12 %
IX. Cortex Chinae DAB 6 ANZAG vom 3.5.1962	Trocknungsverlust			7,42 %
	Gesamt-Alkaloid gehalt	Standardmethode		11,37 %
		nach DAB 7		11,14 %
	Chinin-gehalt	Standardmethode		0,98 %
		Quantitative Chromatographie		2,44 %

daß diese Möglichkeit der unvollständigen Chinintrennung auszuschließen ist. Die Chininzonen erwiesen sich als einheitlich, Verunreinigungen konnten nicht nachgewiesen werden.

4.7.2. Quantitative Dünnschichtchromatographie der bei der Internationalen Standardmethode erhaltenen Tartrate.

Zur Überprüfung der zweiten Möglichkeit: Unvollständige Tartratfällung oder fehlende Übereinstimmung zwischen dem wahren Chinin/Cinchonidinverhältnis und dem für die polarimetrische Bestimmung zugrunde gelegten Tabellenwert, wurden die bei der Internationalen Standardmethode erhaltenen Tartratgemische quantitativ dünnschichtchromatographisch untersucht. Die hierbei erhaltenen Tabellenwerte waren sehr aufschlußreich (Tab. 8).

Während die quantitativ chromatographisch ermittelten Chiningehalte aus den Tartraten der Drogen VI und VII innerhalb der Fehlergrenze mit den polarimetrischen Werten übereinstimmen, enthalten die Tartrate der Drogen VIII und IX einen mehr als doppelt so hohen Chiningehalt als sich aus den entsprechenden Tabellenwerten für die gemessene Polarisation errechnet. Ebenso liegt der Chiningehalt des Tartratniederschlags der Droge II (WOELM VI,54) viel höher als sich aus dem Tabellenwert ergibt und entspricht dem quantitativ chromatographisch aus der Droge ermittelten. Auch die Droge V (Muster 1) zeigt einen leicht erhöhten Chiningehalt. Spalte g und h der Tab. 8 zeigen hingegen, daß der aus den Tartraten der Standardmethode

Tab. 8: Quantitative Dünnschichtchromatographie der nach der Internationalen Standard-methode erhaltenen Tartrate

		Droge II	Droge V	Droge VI	Droge VII	Droge VIII	Droge IX
(a)	Einwaage mg Tartratgemisch in 10,00 ml	109,15 mg in 10,00 ml	261,20 mg in 10,00ml	145,15 mg in 10,00ml	129,00 mg in 10,00ml	92,45 mg in 10,00ml	215,30 mg in 10,00 ml
(b)	polarimetrisch ermittelter Gehalt der Einwaage an Chininbase in mg	31,32 mg Chinin	67,75 mg Chinin	95,28 mg Chinin	90,78 mg Chinin	16,03 mg Chinin	39,79 mg Chinin
(c)	zur Chromatographie aufgetragene Lösungsmenge (a)	36 µl	36 µl	36 µl	36 µl	36 µl	54 µl
(d)	in (c) enthaltene Menge Chinin, polarimetrisch	113 γ	244 γ	343 γ	327 γ	58 γ	215 γ
(e)	quantitativ chromatographisch gefundene Chininmenge im Tartratgemisch	209 γ	320 γ	343 γ	308 γ	135 γ	541 γ
(f)	Chiningehalt von (e) in % des polarimetrischen Geh.	185 %	131 %	100 %	94 %	234 %	251 %
(g)	Chiningehalt der getrockneten Droge aus (e) berechnet	2,42 %	1,97 %	7,30 %	4,87 %	2,13 %	2,47 %
(h)	Chiningehalt nach chromatographischer Methode	2,44 %	2,14 %	7,30 %	5,55 %	2,12 %	2,44 %

Abb. 14:

Tartratniederschlag aus Chinarinde "Boehringer" Muster 1

Kieselgel HR alkalisch

1 = Chinin
2 = Chinidin
3 = Cinchonin
4 = Cinchonidin
5 = Hydrochinin

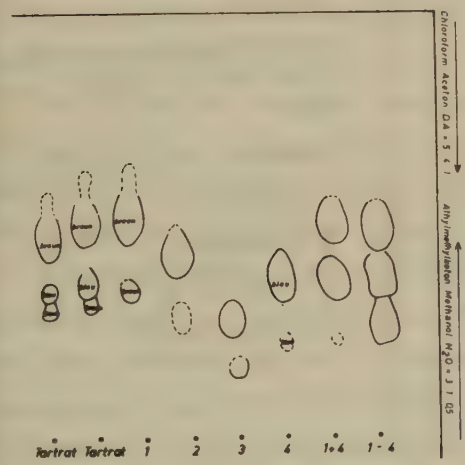


Abb. 15:

Tartratniederschlag aus Chinarinde "Boehringer" Muster 2

Kieselgel HR alkalisch

1 = Chinin
2 = Chinidin
3 = Cinchonin
4 = Cinchonidin

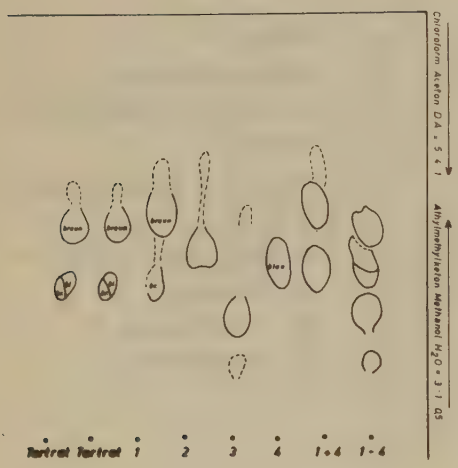


Abb. 16:

Tartratniederschlag aus Chinarinde "Boehringer" Muster 3

Kieselgel HR alkalisch

1 = Chinin

2 = Chinidin

3 = Cinchonin

4 = Cinchonidin

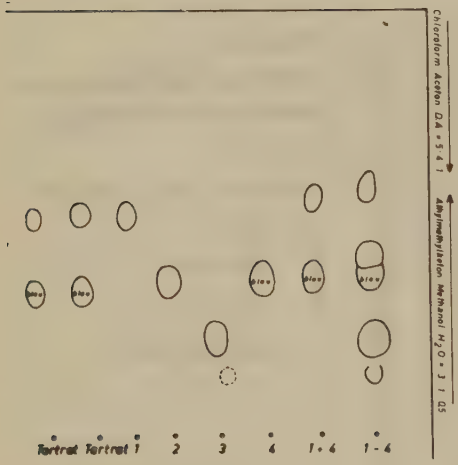


Abb. 17:

Tartratniederschlag aus Cort. Chinae ANZAG 1959

Kieselgel HR alkalisch

1 = Chinin

2 = Chinidin

3 = Cinchonin

4 = Cinchonidin

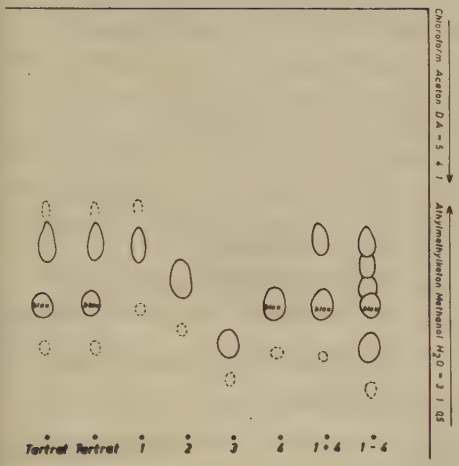


Abb. 18:

Tartratniederschlag aus Cort. Chinae ANZAG 1962

Kieselgel HR alkalisch

1 = Chinin

2 = Chinidin

3 = Cinchonin

4 = Cinchonidin

quantitativ chromatographisch sich ergebende Gehalt an Chinin in befriedigender Weise übereinstimmt mit dem direkt aus der Droge auf gleichem Wege bestimmten.

Die qualitative Zusammensetzung der Tartratgemische ist auf den Abb. 14 - 18 zu erkennen. Neben Chinin und Cinchonidin enthalten fast alle untersuchten Tartrate erwartungsgemäß mehr oder weniger große Mengen der entsprechenden Dihydroprodukte, vor allem Hydrochinin. Obwohl in dem verwendeten Fließmittelsystem Hydrochinin den gleichen Rf-Wert hat wie Cinchonidin und beide Alkaloide im Fleck vermischt sind, konnte durch Anfärbung mit Dragendorff-Jodplateat-Reagenz[1)] eine Unterscheidung erreicht werden. Die methoxylhaltigen Basen zeigen sich nach Detektion mit Dragendorff-Reagenz, mod. nach Thies und

Reuter, und unmittelbar darauf mit Jodplateat-Reagenz als orange-bräunliche Flecken. Die methoxylfreien Basen ergeben nach dieser Detektionsmethode bläulich-schwarze Flecken. Unmittelbar neben oder unterhalb des Cinchonidinflecks, z. T. vermischt mit diesem, war, besonders deutlich bei den Tartratgemischen der Drogen VI und VII, ein bräunlicher Fleck zu erkennen, der mithin aus Hydrochinin bestehen mußte. Hydrocinchonidin war nur bei den Drogen V und IX in Spuren vorhanden.

4.7.3. Diskussion der Ergebnisse.

Die aus der Tab. 8 ersichtlichen Differenzen zwischen den chromatographisch und polarimetrisch ermittelten Chiningehalten legen den Schluß nahe, daß die Faktoren der Tabelle zur Berechnung des Chinin- und Cinchonidingehalts (s. Teil 2, S.126) aus dem Drehungswinkel der Polarisation nicht auf die wahren Verhältnisse zutreffen. Verschiedene Gründe sprechen dafür. Einmal ist kaum anzunehmen, daß den Tabellenwerten von Commelin[13] zum damaligen Zeitpunkt (1912) absolut reine Ausgangssubstanzen zugrunde liegen. Die Reinigung von Chinin und Cinchonidin, vor allem die vollständige Entfernung der Dihydrobasen, ist auch heute noch äußerst schwierig und umständlich, worauf auf S. 79 noch näher eingegangen wird. Bei Chinin kommt neben der Verunreinigung mit Hydrochinin hauptsächlich eine solche mit Cinchonidin in Betracht. Der unterschiedliche Reinheitsgrad der Ausgangssubstanzen zeigt sich

schon darin, daß Hesse[40], Oudemans[66] sowie Kerner und Weller[49] jeweils verschiedene Tabellenwerte angeben, wie auch auf S. 17 bereits erwähnt.

Hinzu kommt noch die Beeinflussung des Drehungsverhältnisses durch wechselnde Mengen an Dihydrobasen aus der Droge (s. Abb. 14 - 18). Daß die Anwesenheit eines dritten optisch aktiven Alkaloids neben Chinin und Cinchonidin die Resultate der optischen Drehung verfälscht, erwähnen schon Kerner und Weller. Auch bei Hesse findet sich der Hinweis, daß der Chiningehalt nach der Standardmethode immer zu niedrig ausfällt, und er führt diesen Umstand ebenso darauf zurück, daß keine reinen Gemenge von Chinin- und Cinchonidintartrat polarisiert werden, sondern solche, die mehr oder weniger viel Hydrochinin und Hydrocinchonidin enthalten. Besonders in ostindischen Rinden sollen beide Dihydroprodukte anwesend sein.

Nicht unerheblich sind bei der Standardmethode ferner methodische Fehler, wie die vielen Analysenschritte, die die Reproduzierbarkeit des Verfahrens von vornherein einengen, oder der kleine Drehungswinkel von 6° - 8°, auf Grund dessen Ableseungenauigkeiten relativ stark ins Gewicht fallen (s. auch S. 17). Bei der Umrechnung in den Konzentrationsmaßstab vergrößert sich der Ablesefehler durch Multiplikation; auch diese Nachteile werden schon von Kerner und Weller erwogen. Die durch Adsorption von Farbstoffen aus der Droge leicht gelb gefärbten Tartrate können auch nicht ohne weiteres mit Modellgemischen bezüglich ihres optischen Verhaltens verglichen werden; hierauf weist bereits Hesse hin (s. auch S. 17), der im übrigen die schärfste Kritik an der Tartratmethode übt. Seinen Beobachtungen zufolge sollen diese Farbstoffe basischer

Natur sein und denselben Gesetzen folgen wie die übrigen Basen.

Unstimmigkeiten zwischen Oudemans und Hesse bezüglich des Kristallwassergehalts der Tartrate, der sich natürlich auf die Berechnung der Tabellenwerte entscheidend auswirkt, sind ebenfalls bereits erwähnt worden (S. 17) und müssen bei der Beurteilung dieses Verfahrens mit berücksichtigt werden.

Aus den angeführten Gründen wird verständlich, daß die Streuung der Standardmethode erheblich ist und der individuelle Fehler sich besonders stark bemerkbar macht. Von daher ist ebenso zu verstehen, daß die beschriebenen Nachteile bei niedrigen Chiningehalten ($\leq$ 2 %) sich stärker auswirken, wie die Tab. 7 und 8 zeigen.

4.7.4. Zuverlässigkeitskontrolle der quantitativen Dünnschichtchromatographie.

Um die Zuverlässigkeit der quantitativen DC-Methode zu kontrollieren, wurde nach dem Prinzip der Zusatzmethode verschiedenen Drogen bestimmte Mengen an Chininbase und anderen Nebenalkaloiden zugesetzt und anschließend der Gesamt-Chiningehalt dieser Drogen quantitativ chromatographisch gemessen (Tab. 9). Wie aus Tab. 9 ersichtlich, konnte in allen Fällen die zugesetzte Menge Chinin wiedergefunden werden. Die Chinintrennung wied folglich durch Art und Menge der Nebenalkaloide nicht beeinträchtigt.

). 9: Quantitative DC verschiedener Drogen, denen Chinin und Nebenalkaloide zugesetzt wurden

	Droge Nr. I	Droge Nr. VIII	Droge Nr. IV
ninningehalt h DC-Methode	2,08 %	2,12 %	1,08 %
esetzte Menge China-Alka- den in %	2,17 % Chinin	3,57 % Chinin 0,45 % Chinidin 0,27 % Cinchonin 0,19 % Cinchonidin 0,36 % Hydrochinin 0,45 % Hydrochinid.	1,85 % Chinin 0,54 % Chinidin 0,36 % Hydrochinin 0,43 % Hydrochinidin
getragene ungsmenge	63 µl	72 µl	63 µl
dergefundene ninmenge	24,2 γ/ml	27,8 γ/ml	17,3 γ/ml
echneter ningehalt n %	4,25 %	5,69 %	2,93 %
undener ningehalt n %	4,24 %	5,46 %	2,89 %

Nachdem die vorliegende Arbeit abgeschlossen war, ergab sich Gelegenheit, die Reproduzierbarkeit der quantitativen DC-Methode den Drogenmustern V, VIII und IX von anderer Seite überprüfen lassen. Die gefundenen Chiningehalte stimmten mit den von mir ittelten befriedigend überein und seien an dieser Stelle wieder-geben (Tab. 10).

Tab. 10: Vergleich zwischen zwei unabhängig voneinander ausgeführten Chininbestimmungen nach der quantitativen DC-Methode

	Droge V	Droge VIII	Droge IX
eigene Ergebnisse	2,14 %	2,12 %	2,44 %
Kontrollbestimmungen	1,91 %	2,16 %	2,45 %

4.7.5. Statistische Überprüfung der Ergebnisse, Ermittlung des Bestimmungsfehlers und des kleinsten gesichert nachweisbaren Meßwerts.

Anhand der vorliegenden Analysenwerte war es möglich, die Reproduzierbarkeit der quantitativ dünnschichtchromatographischen Bestimmungsmethode statistisch abzuschätzen.

Der χ^2-Test ergab, daß die Abweichungen der Einzelwerte aller Drogen vergleichbar waren, der Zufallsfehler in allen Meßserien war mithin gleich groß. Damit ließ sich auch die Standardabweichung und die Reproduzierbarkeit des Verfahrens berechnen. Folgende Verfahrenskonstanten wurden erhalten:

$$\chi^2 = 7,17156$$

$\chi^2(P = 95\ \%, n=8) = 15,507$

$\chi^2(P = 99\ \%, n=8) = 20,090$

$s = \pm 0,09135$ % absol.

$= \pm 3,087$ % relat.

$\Delta x = \pm 0,18316$ % absol.

$= \pm 6,19$ % relat.

$\Delta \bar{x} = \pm 0,06105$ % absol. (Mittelwerte)

$= \pm 2,063$ % relat. (" ")

Mit Hilfe der Regressionsrechnung wurde aus den Extinktions-Mittelwerten der Eichfunktion und den Extinktionen der Analysenwerte der Bestimmungsfehler $\Delta \bar{x}_A$ für jede Droge errechnet (s. Teil 2). Im Durchschnitt betrug er für alle Drogen:

$$\Delta \bar{x}_A = \pm 0{,}568\ \gamma \text{ Chinin/ml}$$

Ebenso konnte aus den experimentell gemessenen Blindwerten der kleinste noch gesichert nachweisbare Meßwert $\bar{c}$ ermittelt werden; er betrug

$$\bar{c} = 0{,}979 - 1{,}014\ \gamma \text{ Chinin/ml}$$

4.7.6. Vorteile der quantitativ dünnschichtchromatographischen Chininbestimmung gegenüber der Internationalen Standardmethode.

Abschließend läßt sich feststellen, daß die quantitativ dünnschichtchromatographische Bestimmung des Chinins aus der Chinarinde bei sorgfältiger Ausführung durchaus zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Gegenüber der Internationalen Standardmethode, der bis heute verbindlichen Methode der Chininbestimmung, weist das Verfahren verschiedene Vorteile auf:

a) Die Gesamtalkaloidbestimmung der Droge erfolgt unabhängig von der Chininbestimmung.

   Gerade bei der Internationalen Standardmethode ist Über-

titration leicht möglich, da der Umschlagspunkt in der gefärbten Extraktlösung schlecht zu erkennen ist. Eine übertitrierte Lösung gibt nicht nur einen geringeren Gesamtalkaloidgehalt, es kann darüberhinaus auch die stöchiometrische Zusammensetzung der bei der Tartratfällung sich niederschlagenden Salze geändert sein.

b) Ermittlung des Chiningehalts direkt aus der Droge ohne Korrekturfaktoren, die die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verschlechtern.

c) Vollständige Abtrennung des Chinins von Nebenalkaloiden; sie läßt sich optisch gut kontrollieren (s. Abb. 12 und 13). Bei der Standardmethode ist die Mitfällung und -bestimmung von Hydrochinin und Hydrocinchonidin nicht zu vermeiden.

d) Geringerer Arbeitsaufwand und damit geringere Gefahr des Einschleppens von systematischen Fehlern.

e) Chininbestimmung gleichzeitig nach zwei voneinander unabhängigen Methoden möglich (photometrisch und fluorimetrisch). Dies bedeutet eine gute Vergleichs- und Kontrollmöglichkeit der erhaltenen Ergebnisse.

f) Größere Genauigkeit bei geringerem Drogenverbrauch.

g) Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, nach der gleichen Methode auch andere China-Alkaloide zu bestimmen (z. B. Chinidin).

5. Untersuchung von Chinin und Chinidin nach dem DAB 7 - Reinigung der Basen.

5.1. Nachweis von Hydrochinin und Hydrochinidin.

5.1.1. Die Bromtitration des Arzneibuchs.

Von den China-Alkaloiden wurden ins DAB 7 Chininbase, Chininhydrochlorid, Chininsulfat und Chinidinsulfat aufgenommen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war von Interesse, zu prüfen, inwieweit verschiedene Chinin- und Chinidin-Präparate des Handels den Anforderungen des Arzneibuchs genügten. Insbesondere interessierte der Gehalt an Dihydrobasen, die heutzutage nahezu ausschließlich als Verunreinigungen in Betracht kommen.

Hydrochinin ist ein steter Begleiter des Chinins und seiner Salze und läßt sich im Fabrikationsprozeß nur unvollständig von diesem trennen bei der herkömmlichen Ausfällung des Chinins als Sulfat. In ähnlicher Weise wird bei Chinidin, das aus den Mutterlaugen der Chininsulfatfällung als schwerlösliches Hydrojodid abgeschieden wird, ebenfalls die Hydrobase mitausgefällt, die sich auch beim nachfolgenden Umkristallisieren der Base nicht mehr entfernen läßt.

Völlig reine Präparate herzustellen, ist deshalb unnötig, weil die Äthylbasen in ihren pharmakologischen Eigenschaften den zugehörigen Vinylbasen sehr ähnlich sind (s. auch S. 12). Die vollständige Entfernung der Äthylbasen würde die Chinin- und Chinidinpräparate verteuern, ohne ihren therapeutischen

Wert wesentlich zu erhöhen. Die Arzneibücher fordern daher auch nur eine Prüfung auf unzulässige Mengen an Hydrobasen. Nach dem DAB 7 wird die Bestimmung bromometrisch nach dem von Böhme und Mitarbeitern[8) - 10)] modifizierten Verfahren von Schulek und Kovacz[86)] durchgeführt. Der Gehalt an Dihydrobase wird hiernach indirekt ermittelt durch Bromierung der Vinylgruppe und jodometrische Erfassung des nicht verbrauchten Broms. Aus der Differenz zwischen Einwaage und anhand des Bromverbrauchs ermittelter Vinylbase ergibt sich der Gehalt an Dihydrobase. Das Arzneibuch toleriert für Chininbase, Chininhydrochlorid und Chininsulfat einen Gehalt von maximal 5 %, für Chinidinsulfat sogar einen Gehalt von maximal 20 % Dihydroverbindung.

5.1.2. Dünnschichtchromatographische Prüfung auf Dihydrobasen.

Mit der dünnschichtchromatographischen Trennung der Vinyl- und der Dihydrobasen auf alkalischen Kieselgelplatten bot sich eine einfache und zuverlässige Methode von großer Empfindlichkeit an, um den Reinheitsgrad der Vinylbasen qualitativ zu kontrollieren.

Bereits Suszko-Purzycka und Trzebny[95)] hatten sich mit der dünnschichtchromatographischen Prüfung von handelsüblichen Chinin, Chinidin-, Cinchonin- und Cinchonidinpräparaten befaßt. Sie fanden, daß Chinidin- und Cinchoninderivate den höchsten Gehalt an Dihydrobase aufwiesen, Salze waren weniger verunreinigt als die freien Basen. Die Chromatographie mit dem

Elutionsmittel dieser Autoren (Chloroform/Methanol/Diäthylamin) erwies sich als ungünstig. Trennung der Vinyl- und Dihydrobasen gelang zwar, wurde aber dadurch erschwert, daß die Entwicklerflüssigkeit leicht zur Entmischung auf der Dünnschichtplatte neigte. Die unterschiedlichen Entmischungszonen brachten eine starke Verzerrung der Rf-Werte mit sich.

Brauchbarer für die Prüfung von Chinin und Chinidin erwies sich das Laufmittel
Methyläthylketon : Methanol : Wasser = 3 : 1 : 0,5
das bei der Auftrennung der Basen gut reproduzierbare Rf-Werte geliefert hatte (s. S. 31).

Von verschiedenen Chinin- und Chinidinbasen des Handels wurden mit einer Kolben-Mikrometerspritze mit Mikrometervorschub steigende Mengen einer 2-proz. äthanolischen Lösung der jeweiligen Base auf eine alkalische Kieselgel G - Platte aufgetragn und mit obigem Fließmittel entwickelt. Es zeigte sich, daß alle untersuchten Chinin- und Chinidinbasen mit Dihydrobase verunreinigt waren. Die Auftragemethode erlaubte eine grobe Abschätzung des jeweiligen Gehalts durch Vergleich der Fleckengrößen.

5.1.3. Reinheitsprüfung von Handelspräparaten.

Zur genaueren Ermittlung des Hydrochinin- bzw. Hydrochinidingehalts wurde anschließend bei jeder Base sowie bei einigen Chinin- und Chinidinsalzen eine Bromtitration nach

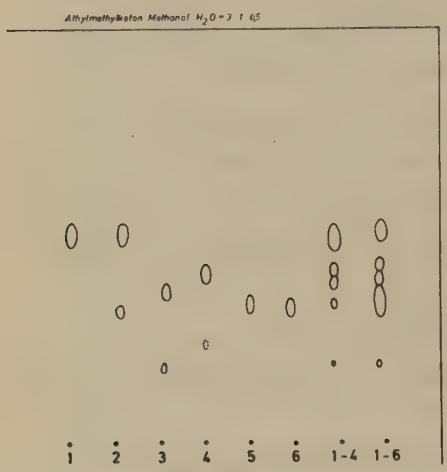


Abb. 19:
Kieselgel G alkalisch

1 = Chinin
2 = Chinidin
3 = Cinchonin
4 = Cinchonidin
5 = Hydrochinin
6 = Hydrochinidin

dem DAB 7 durchgeführt. Als weitere Konstanten wurden bei den Basen die Schmelztemperatur auf verschiedenen Schmelzpunktsgeräten und die optische Drehung bestimmt. Aus den Ergebnissen der Bromtitration ließ sich erkennen, daß nur wenige Chininbasen den Anforderungen des Arzneibuchs entsprachen bezüglich ihres Hydrochiningehalts (s. Tab. 6 , Teil 2). Die untersuchten Chininsalze lagen mit dem Gehalt an Hydroderivaten durchweg höher als das Arzneibuch erlaubt. Lediglich die Chinidinpräparate entsprachen den Anforderungen des DAB 7. Der optische Drehungswinkel zeigte eine gewisse Abhängigkeit vom Gehalt an Hydrochinin, während die Bestimmung der Schmelztemperatur recht unspezifisch war. Allerdings hat das DAB 7 für den Wert der Spezifischen Drehung ziemlich weite Grenzen gezogen, so daß selbst Substanzen mit einem unzulässig hohen

Gehalt an Hydrochinin bzw. Hydrochinidin noch innerhalb des geforderten Bereichs von - 159° - - 172° bzw. + 277° - + 290° liegen.

Daß durch mehrfaches Umkristallisieren (s. S.111, Teil 2) der Vinylbasen Verunreinigungen mit Äthylbasen sich nicht beseitigen lassen, wurde bereits bei den qualitativ dünnschichtchromatographischen Trennungsversuchen der China-Alkaloide beobachtet. Bei den gereinigten Basen trat häufig Doppelfleckenbildung auf. Dieses Phänomen war deutlich bei den Vinylbasen Chinidin, Cinchonin und Cinchonidin nach Chromatographie mit den Fließmitteln der Gruppe 2 zu beobachten. Der jeweilige Nebenfleck hatte stets den gleichen Rf-Wert wie die entsprechende Äthylbase (s. Abb. 19). In gleicher Weise läßt sich auch die Beobachtung von Vácha und Mitarbeitern[98] deuten, daß die Dünnschichtchromatographie von Chinin auf Silikagel immer zwei eng hintereinander herlaufende Flecken zum Vorschein brachte - eine Beobachtung, die auch Waldi, Schnackerz und Munter[100] bei der Dünnschichtchromatographie von Chinidin machten.

Ebenso stellten Hadorn und Zürcher[30] fest, daß Chininpräparate des Handels bei der Dünnschichtchromatographie sich in einen Haupt- und einen Nebenfleck aufspalteten. Die Autoren kamen auf Grund der UV-Spektren dieses Nebenflecks zu dem Schluß, daß es sich hierbei um ein Zersetzungsprodukt des Chinins handeln müsse. Die gewählten Chromatographiebedingungen von Hadorn und Zürcher (Kieselgel G und Methanol/Aceton) sprechen aber dafür, daß es sich bei dem Nebenfleck

ebenfalls um Hydro-Chinin handelt. Das abweichende UV-Spektrum läßt sich dadurch erklären, daß die gemessene Hydrochininkonzentration zu gering war, so daß praktisch nur die Untergrundabsorption des Kieselgels (Kieselgelblindwert) aufgenommen wurde (Abb. 20).

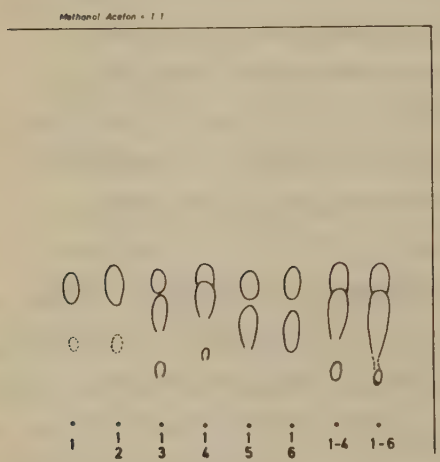


Abb. 20:
Kieselgel G

1 = Chinin
2 = Chinidin
3 = Cinchonin
4 = Cinchonidin
5 = Hydrochinin
6 = Hydrochinidin

5.2. Reinigungsverfahren für Chinin und Chinidin.

5.2.1. Die Quecksilberacetatmethode.

Diese Beobachtungen zeigen also, daß mehrfaches Umkristallisieren nicht ausreicht, um handelsübliche Vinylbasen frei von Dihydrobasen zu erhalten.

Literaturangaben über Schmelztemperatur und Spezifische Drehung des Chinins und Chinidins schwanken sehr und enthalten in der Regel keinen Hinweis über die Reinheit der untersuchten Substanzen. Es lag daher nahe, die Angaben des DAB 7 an reinem Chinin und Chinidin, frei von Dihydrobase, zu überprüfen.

Eine Methode zur Trennung und Reindarstellung von Vinyl- und Dihydrobase ist von Thron und Dirscherl[96] ausgearbeitet worden. Die Trennung läßt sich durchführen auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeit von Quecksilber(II)-verbindungen mit Vinylbasen und den Dihydroverbindungen in Ammoniak und Äther. Quecksilber(II)-acetat reagiert mit Vinylbasen zu einem Anlagerungsprodukt der allgemeinen Formulierung R - CH(HgOH) - CH_2OH. Das Addukt ist in Ammoniak leicht, in Äther unlöslich. Die Äthylbasen sind alle in Ammoniak schwer und einige leicht in Äther löslich. Die Zerlegung der Quecksilber-Anlagerungsverbindung gelingt mit Phosphoriger Säure. Nach diesem Verfahren läßt z. B. die Pharmacop. Danica 1948 den Gehalt an Äthylverbindungen von Chininhydrochlorid, Chininsulfat und Chinidinsulfat ermitteln.

Nach dieser Methode wurden nun Chininum sulfuricum DAB 6 (Boehringer/Mannheim) und Chinidinum sulfuricum (Merck) gereinigt. Die isolierten Vinylbasen und die Äthylbasen wurden umkristallisiert und die Schmelzpunkte bestimmt.

Um die Abwesenheit von Äthylbase zu kontrollieren, wurden in gleicher Weise wie oben steigende Mengen der gereinigten Chinin- und Chinidinbase auf alkalische Kieselgel G-Platten

aufgetragen und mit

Methyläthylketon : Methanol : Wasser = 3 : 1 : 0,5

entwickelt. Das Ergebnis ist aus den Abb. 21 und 22 zu ersehen.

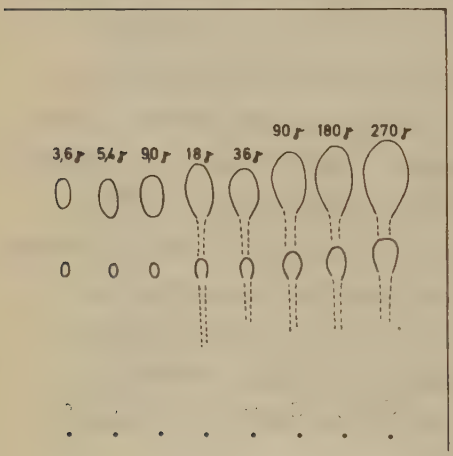


Abb. 21:
Chininbase nach der Quecksilberacetat methode gereinigt

Kieselgel G alkalisch

Methyläthylketon : Methanol : Wasser = 3 : 1 : 0,5

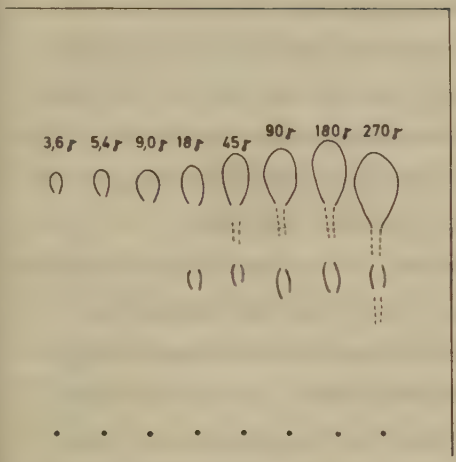


Abb. 22:
Chinidinbase nach der Quecksilberacetatmethode gereinigt
Kieselgel G alkalisch
Methyläthylketon : Methanol : Wasser = 3 : 1 : 0,5

Bei Chinidin sind nur noch Spuren von Dihydrobase zu erkennen, dagegen ist Chinin noch stark mit Hydrochinin verunreinigt. Dieses Ergebnis erscheint nicht erstaunlich, wenn man bedenkt, daß Hydrochinin und Hydrochinidin, die nach der Vorschrift von Thron und Dirscherl aus der ammoniakalischen Lösung der Merkuri-Vinylverbindungen ausgeäthert wurden, in Ammoniak nicht völlig unlöslich sind. Gerade die Ammoniakprobe des DAB 6 nach Kerner und Weller beruht ja auf dem e r h ö h t e n Ammoniakverbrauch, der zur Lösung der Nebenalkaloide des Chinins notwendig ist. Daß es sich bei den

Nebenflecken tatsächlich um Dihydrobasen handelte, konnte damit gezeigt werden, daß die Hauptflecken ausgekratzt, mit Methanol eluiert und erneut auf alkalische Kieselgelplatten aufgetragen wurden. Nach wiederholtem Entwickeln mit obigem Fließmittel war nur noch der Fleck der Vinylbase zu erkennen.

Darüberhinaus weist die Quecksilberacetatmethode nach Thron und Dirscherl einige bemerkenswerte Nachteile auf, die sich störend auf die Trennung der Basen auswirken:

a) Beim Ausfällen der Dihydrobasen mit Ammoniak bildet sich offenbar mit überschüssigem Quecksilber(II)-Salz eine Quecksilberamidoverbindung, die als weißer Niederschlag mitausfällt und Dihydrobase vortäuscht. Die gleiche Erscheinung tritt beim Ausfällen der Vinylbasen auf, hier offenbar hervorgerufen durch unvollständige Reduktion des Hg^{++} mit Phosphoriger Säure.

b) Das reduzierte Quecksilber läßt sich trotz mehrfacher Filtration durch Blaubandfilter nur unvollständig aus Lösungen der Vinylbasen entfernen und behindert das nachfolgende Umkristallisieren.

Die Quecksilberacetat-Methode ist somit wenig geeignet für eine Reinigung von Chinin und Chinidin.

5.2.2. Reinigung der Basen durch Präparative Schichtchromatographie.

Eine andere Reinigungsmethode liegt in der Möglichkeit, die qualitative dünnschichtchromatographische Trennung der Vinyl- und Dihydrobasen direkt in den präparativen Maßstab

zu übertragen nach dem von Halpaap[32)] beschriebenen Prinzip der Präparativen Schichtchromatographie.

Diese Methodik, die aus der analytischen Dünnschichtchromatographie entwickelt wurde, hat in den vergangenen Jahren auf vielen Gebieten die Säulenchromatographie weitgehend verdrängt und ist nahezu universell verwendbar. Gegenüber der säulenchromatographischen Reinigung ergeben sich verschiedene Vorteile. Einmal sind Arbeitsgeräte, Sorbentien und Fließmittel aus der analytischen Dünnschichtchromatographie unmittelbar in den präparativen Maßstab übertragbar, andererseits sind die Trennzeiten sehr viel kürzer und der Fließmittelverbrauch erheblich niedriger, verglichen mit der eluierenden Säulenchromatographie. Bedingt durch die größere Oberfläche des Sorbens ist die Trennschärfe wesentlich höher bei größerer Aufnahmekapazität. Durch Mehrfachentwicklung wird der Nachteil der kurzen Trennstrecke ausgeglichen. Ein Wärmestau, wie er an der Säule bei hochaktiven Sorbentien häufig beobachtet wird und der zur Verschmierung der Substanzzonen führt, kann auf der beschichteten Platte nicht auftreten. Schließlich ergibt sich auch in der einfachen Nachweismöglichkeit der getrennten Stoffe durch Markierung der Bänder unter der UV-Lampe ein bemerkenswerter Vorzug. Häufig lassen sich Trennungen schon während der Entwicklung bei Bestrahlung mit UV-Licht verfolgen (z. B. bei farblosen, fluoreszierenden Substanzen). Die Bandbreite der entwickelten Substanzzonen ist in erster Linie von der aufgetragenen Konzentration abhängig, jedoch besteht keine direkte Proportionalität zwischen Auftragekonzentration und Bandbreite. Daneben

spielt auch das Laufmittel eine Rolle; mit steigender Polarität des Entwicklers nimmt die Bandbreite zu. Außerdem haben auch bei unpolaren Elutionsmitteln - je nach Lösungsvermögen verschieden - Diffusionsvorgänge Einfluß auf die Bandbreite. Halpaap konnte zeigen, daß die Trennungsgüte für einzelne Substanzzonen ein Optimum durchläuft, das von der Anzahl der Entwicklungen abhängt. Aus diesen Gründen erweist es sich oftmals als günstig, die Zusammensetzung bewährter Laufmittelsysteme aus der analytischen Dünnschichtchromatographie für die Verwendung in der Präparativen Schichtchromatographie geringfügig zu variieren. Zeigt sich eine Substanz in einer bestimmten Fließmittelkombination unterhalb einer empirisch ermittelten Höhe, ist der hydrophilere Anteil, zeigt sie sich oberhalb, ist der hydrophobere Anteil des Fließmittels zu erhöhen.

Für das vorliegende Reinigungsproblem war es vorteilhaft, den polaren Anteil der Fließmittelkombination zu erhöhen. Mit der Kombination

Methyläthylketon : Methanol : Wasser = 2 : 1 : 1

ließ sich auf etwa 2 mm dicker Kieselgelschicht bereits nach ein- bis zweimaliger Entwicklung noch maximal 400 mg Base (40·20 cm Platten) gut in Vinyl- und Dihydroverbindung trennen. Die Gesamtentwicklungsdauer betrug hierbei 3 Stunden (Abb. 23).

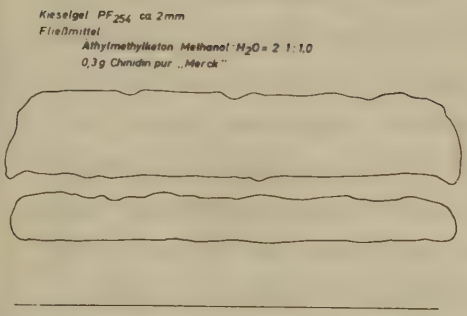


Abb. 23:
Präparativ schichtchromatographische Reinigung von Chinidin

Weitere Erhöhung des Methanol- oder Wassergehalts brachte keine Verbesserung im Trennungseffekt, hingegen verlängerte sich die Entwicklungsdauer erheblich.

Neben Chinin- und Chinidinbase wurden auf die gleiche Art auch Hydrochinin- und Hydrochinidinbase gereinigt.

Nach Elution der Kieselgelzonen und Einengen der Eluate wurden die Basen umkristallisiert und getrocknet. Die Ausbeute bei allen präparativ schichtchromatographisch gereinigten Substanzen lag zwischen 30 und 40 %. Dies ist relativ wenig im Vergleich zu den Angaben von Halpaap, der nahezu verlustlos arbeitete. Die geringe Ausbeute läßt sich nicht allein mit der irreversiblen Adsorption von Substanz an die Sorptionsschicht erklären. Dagegen kann eine partielle Veränderung der Basen durch die aktive Kieselgelschicht im Sinne

einer Umwandlung zu Chininon oder Chinicin (Chinotoxin) nicht ganz ausgeschlossen werden. Die Kieselgeleluate waren immer leicht gelblich gefärbt, auch wenn in der Kälte eluiert worden war. Ernst nach mehrmaligem Umkristallisieren des gelblichen Rückstands war die Mutterlauge farblos. Chinicin wird in der Literatur als gelblicher Firnis beschrieben und entsteht unter vergleichsweise milden Bedingungen bereits beim Erhitzen von Chinin in verdünnter Essigsäure[34]. Auf eine mögliche Veränderung der Substanzen bei der Präparativen Schichtchromatographie durch die aktive Kieselgelschicht weisen auch Halpaap[32], Gänshirt[23] und Honegger[42] hin.

Die präparativ schichtchromatographisch gereinigten und umkristallisierten Basen wurden anschließend dünnschichtchromatographisch, wie auf S.81 beschrieben, auf Reinheit geprüft. Weiterhin wurden die Schmelzpunkte und die Spezifische Drehung ermittelt, sowie mit Hilfe der Bromtitration der Gehalt an Dihydro- bzw. Vinylbase geprüft. Die Spezifische Drehung wurde außerdem von den Hydrochloriden des Chinins und Hydrochinins, sowie von den Sulfaten des Chinins, Hydrochinins, Chinidins und Hydrochinidins gemessen. (Tab. 11 und Abb. 24 - 27)

Tab. 11: Physikalische Konstanten von präparativ schichtchromatographisch gereinigten Chinabasen und deren Salzen, sowie Gehalt an Dihydro- bzw. Vinylbase nach DAB 7

Substanz	Kapillarmethode	Schmelzpunkte Metallblock	Schmelzpunktmikroskop LEITZ	Spezifische Drehung	Gehalt an Hydro- bzw. Vinylbase
Chininbase	177,5-178,0°	175,8-176,2° = 176,7° k	176,0 - 178,0°	$[\alpha]_D^{20} = -166,0° \pm 1°$ c=1,5 absol.Alkohol	100,16 %; 99,94 % 101,14 %
Chinin - hydrochlorid				$[\alpha]_D^{20} = -253,0° \pm 1,2°$ c=2,0; 0,1n- HCl	
Chininsulfat	(216 -217°)		(202 - 203°)	$[\alpha]_D^{20} = -245,0° \pm 1°$ c=2,0; 0,1 n- HCl	
Chinidinbase	175,0-175,5°	174,4-175,0° = 175,3° k	175,5 - 176,0°	$[\alpha]_D^{20} = +267,0° \pm 1,5°$ c=1,5; absol.Alkohol	99,23 %; 100,58 % 100,81 %
Chinidinsulfat				$[\alpha]_D^{20} = +289,0° \pm 0,8°$ c=2,0; 0,1 n-H_2SO_4	
Hydrochininbase	174,5-175,0°	173,8-174,4° = 174,8° k	175,5 - 176,0°	$[\alpha]_D^{20} = -142,0° \pm 0,8°$ c=1,5; absol.Alkohol	98,13 %; 99,40 % 100,00 %
Hydrochininhydrochlorid				$[\alpha]_D^{20} = -213,0° \pm 1°$ c=2,0; 0,1 n- HCl	
Hydrochininsulfat				$[\alpha]_D^{20} = -205,5° \pm 0,9°$ c=2,0; 0,1 n- HCl	
Hydrochinidinbase	173,0-173,5°	172,6-173,4° = 173,6° k	173,5 - 174,5°	$[\alpha]_D^{20} = +232,0° \pm 1,6°$ c=1,5; absol.Alkohol	99,35 %; 98,75 % 99,95 %

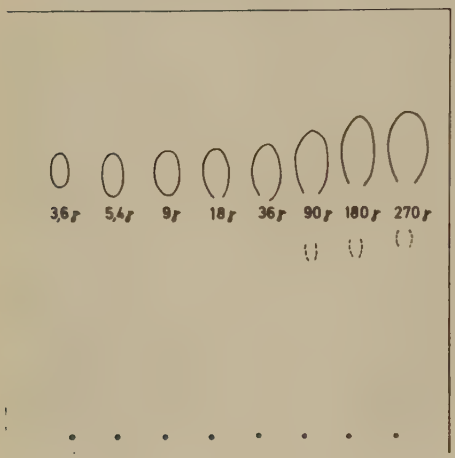


Abb. 24:
Chininbase
präparativ schicht-
chromatographisch
gereinigt
Kieselgel G alkalisch
Methyläthylketon :
Methanol : Wasser =
3 : 1 : 0,5

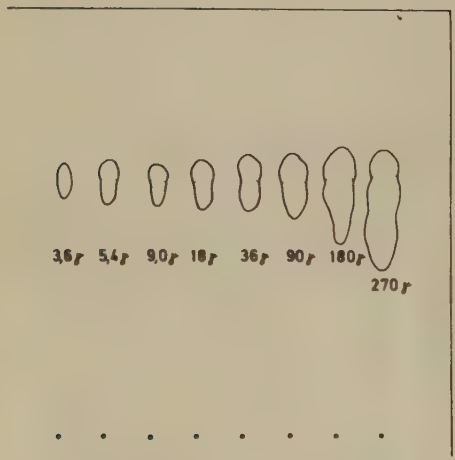


Abb. 25:
Chinidinbase
präparativ schicht-
chromatographisch
gereinigt
Kieselgel G alkalisch
Methyläthylketon :
Methanol : Wasser =
3 : 1 : 0,5

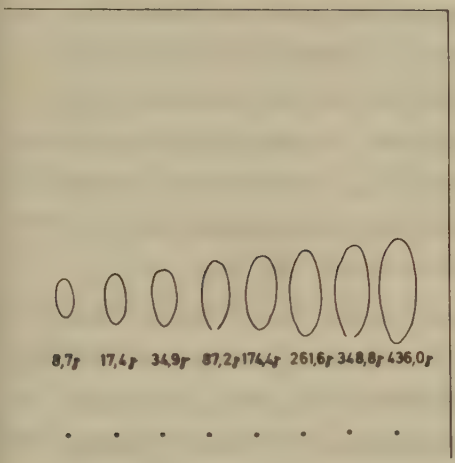


Abb. 26:
Hydrochininbase
präparativ schicht-
chromatographisch
gereinigt
Kieselgel G alkalisch
Methyläthylketon :
Methanol : Wasser =
3 : 1 : 0,5

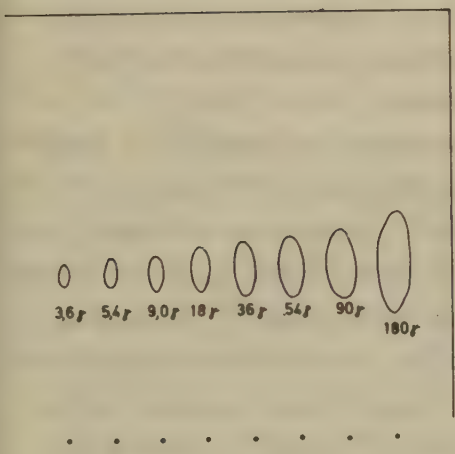


Abb. 27:
Hydrochinidinbase
präparativ schicht-
chromatographisch
gereinigt
Kieselgel G alkalisch
Methyläthylketon :
Methanol : Wasser =
3 : 1 : 0,5

Die Dünnschichtchromatographie wie auch die Bromtitration lassen erkennen, daß die nach diesem Verfahren erhaltenen Substanzen sich durch hohe Reinheit auszeichnen. Ein Gehalt an Dihydrobase bzw. Vinylbase ist dünnschichtchromatographisch nicht mehr feststellbar. Aus den erhaltenen Werten der Bromtitration ist zu ersehen, daß deren Genauigkeit $\pm$ 2 % max. beträgt.

Bei der Spezifischen Drehung wurden für die Salze Chininhydrochlorid und Chininsulfat die im DAB 7 angegebenen Maximalwerte gefunden. Der für Chinidinsulfat ermittelte Drehungswinkel stimmt annähernd mit dem Maximalwert überein. Lediglich der Drehwert für Chininbase liegt um 6° tiefer als der Maximalwert des DAB 7. Ablesefehler können nicht der Grund sein, da das benutzte Gerät den Drehungswinkel bis auf 0,01° genau abzulesen gestattet. Der vom DAB 7 angegebene Drehungswinkel von - 172° für Chininbase konnte andererseits auch in der Literatur nirgends gefunden werden.

Oudemans[66] gibt für wasserfreies Chinin $[\alpha]_D^{17}$ = - 167,5° (c=1,6; absoluter Alkohol) und $[\alpha]_D^{15}$ = - 169,3° (c=2,0; 97-proz. Alkohol) an. Bei Hesse[37] finden sich die Werte $[\alpha]_D^{15}$= - 169,25° (c=2; 97-proz. Alkohol) und $[\alpha]_D^{15}$ = - 170,50° (c=1; 97-proz. Alkohol). Wherry und Janovsky[103] bestimmten die Spezifische Drehung zu $[\alpha]_D^{20}$= - 166,6°. Auch in Literaturstellen aus neuerer Zeit sind vergleichbare Drehwerte zu finden, so z.B. bei Mathieu und Janot[61] $[\alpha]_D^{14-25}$ = -168 $\pm$ 1° (c=0,25 - 2,0; absoluter Alkohol) und bei Utermark und Schicke[97] $[\alpha]_D^{17}$ = -167° (Alkohol). Auch mit einer denkbaren Verunreinigung durch andere Cinchona-Alkaloidbasen wäre ein Drehwert

von - 172° nicht zu verstehen, da es solche mit einer höheren Spezifischen Drehung nicht gibt. Für Cinchonidinbase z.B. wird in der Literatur ein Drehungswinkel von - 108,5° (c=1-4; absoluter Alkohol) angegeben. Ebenso ergibt ein Vergleich der Toleranzgrenzen des Arzneibuchs für die aufgenommenen China-Salze mit den gefundenen Werten für die Dihydroderivate, daß bei Chininhydrochlorid und Chininsulfat eine Verunreinigung von etwa 30 % an Dihydrosalzen den Anforderungen des DAB 7 noch gerecht wird. Bei Chinidinsulfat und Chininbase liegen sogar Gehalte bis zu mehr als 40 % an Dihydroderivaten noch innerhalb der Toleranzgrenzen.

5.2.3. Infrarot- und Kernresonanz-Spektren der China-Alkaloide.

Von den präparativ schichtchromatographisch gereinigten Basen wurden zusätzlich die Infrarot- und die Kernresonanz-Spektren aufgenommen; zu Vergleichszwecken daneben auch diejenigen von Cinchonin- und Cinchonidinbase, die nach der Quecksilberacetatmethode gereinigt worden waren aus Cinchoninum purum cryst. "Boehringer" und Cinchonidin rein "Th. Schuchardt". Infrarot-Spektren der wichtigsten China-Alkaloidbasen finden sich in vielen Veröffentlichungen[29) 33) 74) 75) 84) 98)].

Auf den Spektren ist bei allen Basen die breite, langwellig verschobene Assoziationsschwingung der Hydroxyl-Valenzschwingung im Bereich 3,00 - 3,35 µ (3000 - 3300 cm^{-1}) gut zu erkennen (Abb. 28 - 33). Bemerkenswert ist eine kleine

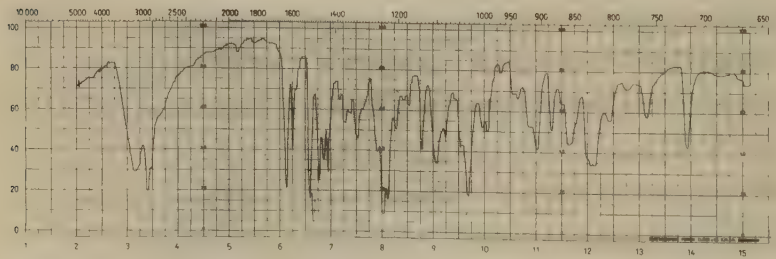
Schulter im Bereich von 3,00μ(3300 cm^{-1}) bei Chinidin, Cinchonin, Cinchonidin und Hydrochinidin (bei Cinchonin ist an dieser Stelle sogar eine schwache Bande ausgeprägt), die bei Chinin und Hydrochinin fehlt.

Aufgrund dieser schwachen Absorption allein läßt sich nicht klar entscheiden, ob polymere Assoziation oder intramolekulare Wasserstoff-Brückenbindung vorliegt.

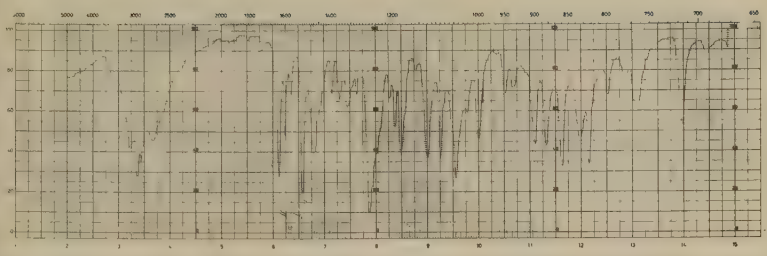
Aus der Verschiebung der Hydroxyl-Absorptionsbande von 3,20 μ (3100 cm^{-1}) bei Chinin und Hydrochinin nach 3,30 μ (3000 cm^{-1}) bei Chinidin, Cinchonin, Cinchonidin und Hydrochinidin, nach dem längerwelligen also, läßt sich in Übereinstimmung mit den Befunden von Roth[84] vermuten, daß die Wasserstoff-Brückenbindung bei den letzteren Basen stärker ist als bei Chinin und Hydrochinin.

Auch die Verschiebung der Hydroxyl-Deformationsschwingung, die für Chinidin, Cinchonin und Hydrochinidin bei 9,50 - 9,60 μ (1040 - 1050 cm^{-1}) liegt, nach 9,70 μ (1030 cm^{-1}) bei Chinin, Cinchonidin und Hydrochinin spricht dafür.

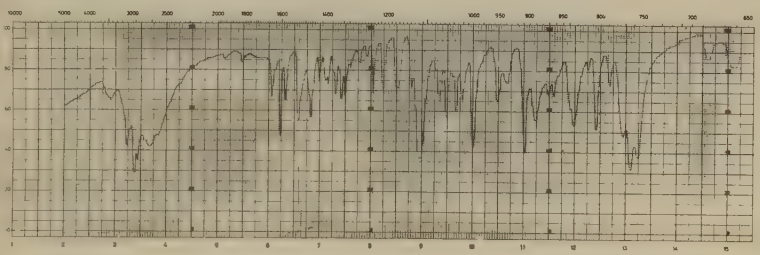
Diese Bindungsunterschiede sind nur möglich durch verschiedene räumliche Struktur der betreffenden Basen.



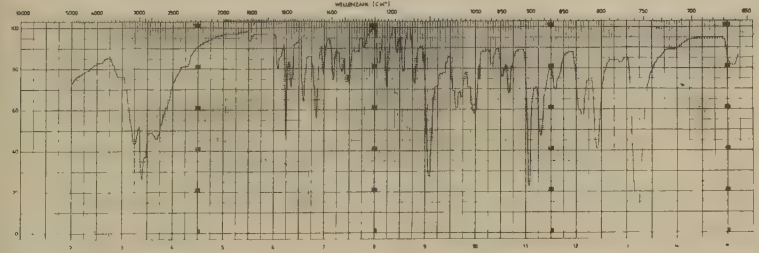
IR-Spektrum von Chinin (Abb. 28)



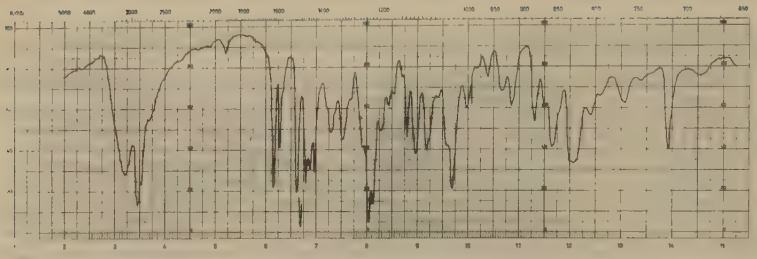
IR-Spektrum von Chinidin (Abb. 29)



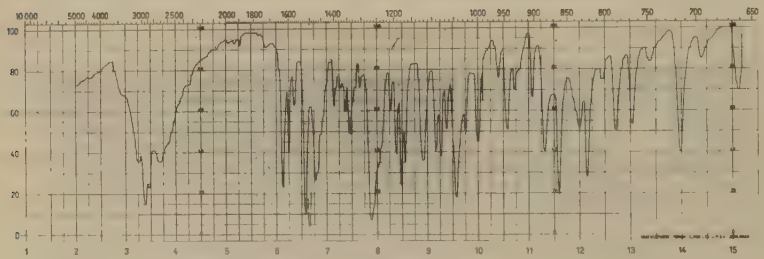
IR-Spektrum von Cinchonin (Abb. 30)



IR-Spektrum von Cinchonidin (Abb. 31)



IR-Spektrum von Hydrochinin (Abb. 32)



IR-Spektrum von Hydrochinidin (Abb. 33)

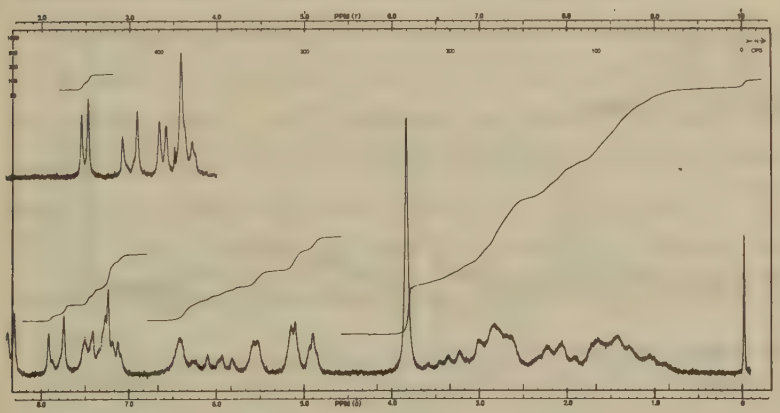
Gut erkennbar ist ferner die starke Bande der CH_2 - Kippschwingung bei 11,00 - 11,10 μ (900 - 910 cm^{-1}), die in Verbindung mit der = CH - Kippschwingung bei 10,00 - 10,10 μ (990 - 1000 cm^{-1}) der Vinylgruppe zugeordnet werden kann und bei Hydrochinin und Hydrochinidin fehlt. Die sehr stark ausgeprägte = C-O- Valenzschwingung der Methoxyl-Äthergruppe bei 7,90 - 8,05 μ (1240 - 1260 cm^{-1}) fehlt erwartungsgemäß bei Cinchonin und Cinchonidin.

Auf den Kernresonanz-Spektren tritt bei Chinin, Chinidin, Hydrochinin und Hydrochinidin das charakteristische Signal der Methoxyl-protonen bei 3,9 ppm deutlich in Erscheinung (Abb. 34 - 36).

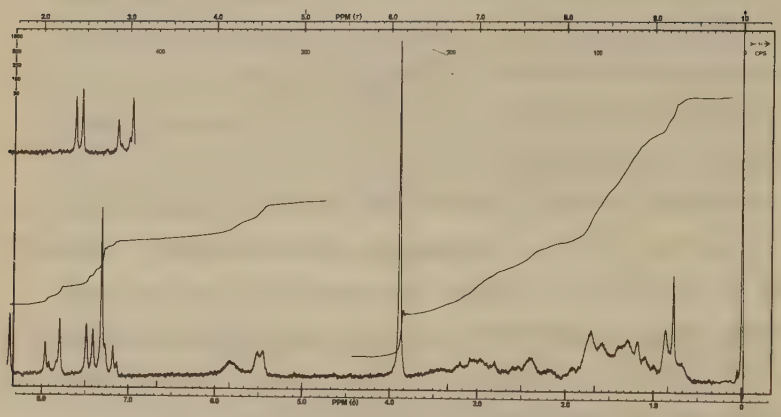
Die Vinylprotonen sind in mehrere Signale aufgespalten und erscheinen bei 4,8 - 5,1 ppm bei Chinin und Chinidin; bei Cinchonin und Cinchonidin sind die Signale nach 5,0 - 5,5 ppm verschoben durch den Einfluß des Lösungsmittels (Deuterotrifluoressigsäure).

Das Signal des an C_9 gebundenen Protons erscheint bei ca. 5,5 ppm (6,7 ppm bei Cinchonin und Cinchonidin), weitere Peaks an dieser Stelle rühren wahrscheinlich von den Vinylprotonen her (s. auch Jachontov, Mastafanova, Portnova und Rubcov[45]). Gut zu erkennen sind die Signale der Äthylprotonen von Hydrochinin und Hydrochinidin bei 0,9 ppm.

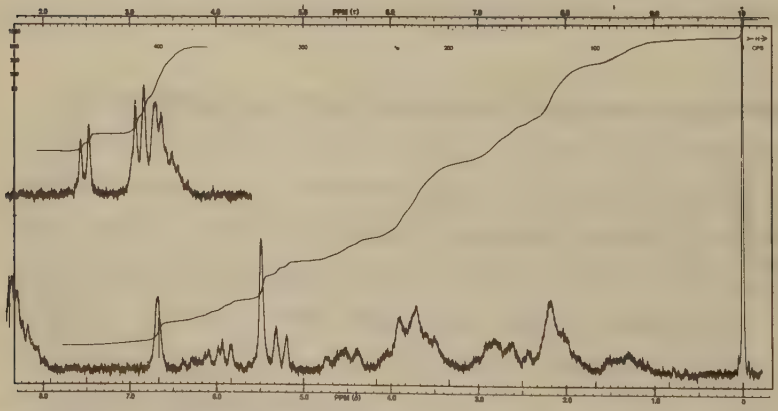
Die Protonen des Chinuklidinrings geben bei ca. 1,6 - 2,9 ppm unspezifische Signale (2,1 - 3,9 ppm bei Cinchonin und Cinchonidin), wie aus einem Vergleich mit dem Spektrum des Chinuklidins ersichtlich wird (Abb. 37).



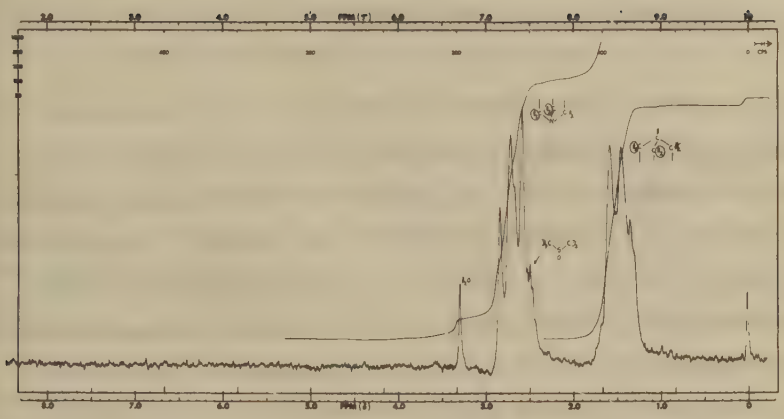
Kernresonanzspektrum von Chinin und Chinidin in $CDCl_3$ (Abb. 34)



Kernresonanzspektrum von Hydrochinin und Hydrochinidin (Abb. 35) in $CDCl_3$



Kernresonanzspektrum von Cinchonin und Cinchonidin (Abb. 36) in CF_3CO_2D



Kernresonanzspektrum von Chinuklidin in $CDCl_3$ (Abb. 37)

Prüfung von Chinidinsulfat auf Chinin mit Silbernitrat.

Zur Unterscheidung zwischen Chinidin- und Chininsulfat schreibt das DAB 7 eine Prüfung mit Silbernitrat vor.

Silbernitrat gibt mit Chinidinsulfat in neutraler Lösung einen weißen Niederschlag, der in 3n-Salpetersäure löslich ist. Chinin ergibt unter gleichen Bedingungen nur eine sehr geringe und wesentlich langsamer einsetzende Trübung. Diese Probe wurde in verschiedene Arzneibücher aufgenommen[12) 16) 69) 70)], ohne daß über den Reaktionsmechanismus und die Zusammensetzung dieses Niederschlags hinreichende Klarheit bestehen.

Strecker[94)] beschreibt die Fällung eines "Silberoxyd-Chinins" aus alkoholischer Lösung mit Silbernitrat. Hesse[35)] berichtet über die Darstellung von salpetersaurem Chinidin,

ohne freilich Einzelheiten der Darstellung mitzuteilen. Neuere Literaturangaben finden sich nicht.

Zur Klärung der Zusammensetzung dieses Niederschlags wurde daher präparativ schichtchromatographisch gereinigte Chinidinbase (Reinigung s. S.122) in verdünnter Schwefelsäure zum Sulfat gelöst, mit verdünntem Ammoniak neutralisiert und nach der Vorschrift des DAB 7 mit 5-proz. Silbernitratlösung versetzt. Der Niederschlag wurde gründlich mit Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die qualitative Prüfung brachte den Nachweis von Silber, Nitrat und Sulfat.

Der quantitative Gehalt des Niederschlags an Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel wurde durch Elementaranalyse ermittelt. Unabhängig davon wurde der Gehalt an Silber, Nitrat und Sulfat bestimmt. Die Silberbestimmung wurde mit 0,1 n -Ammoniumrhodanidlösung nach Volhard maßanalytisch durchgeführt. Der Sulfatgehalt ließ sich ebenfalls maßanalytisch mit 0,02 n - Bariumperchloratlösung bestimmen. Die Nitratbestimmung erfolgte photometrisch durch Messung der Farbreaktion mit Diphenylamin-Schwefelsäure.

Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse deutet mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auf eine Molekularverbindung des Chinidinsulfats mit Silbernitrat hin. Die beste Übereinstimmung der berechneten und der gefundenen Werte ergab sich dann, wenn ein Gehalt von 2 Molekülen Kristallwasser im Niederschlag angenommen wurde.

In der nachstehenden Tab. 12 sind die gefundenen und die berechneten Werte gegenübergestellt.

Tab. 12 : Quantitative Zusammensetzung des Niederschlags von Chinidinsulfat mit Silbernitrat.

		berechnet	gefunden
Kohlenstoffgehalt		50,42 %	50,34 % 50,64 %
Wasserstoffgehalt		5,50 %	5,60 % 5,66 %
Gesamt-Stickstoffgehalt		7,35 %	7,28 %
Nitratgehalt		6,51 %	5,56 %
Schwefelgehalt	Elementaranalyse	3,36 %	3,43 % 3,56 %
	über Sulfatbest.	3,36 %	3,08 %
Silbergehalt		11,32 %	11,32 %

Vermutete Zusammensetzung des Niederschlags:

$$(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot AgNO_3 \cdot 2\ H_2O$$

Molekulargewicht: 952,84

Die obige Formel wurde den Berechnungen zugrunde gelegt. Die gute Übereinstimmung der berechneten Werte und der gefundenen Werte spricht damit stark für die postulierte Zusammensetzung des Niederschlags. Die Eigenschaft der China-Alkaloide, mit den verschiedensten organischen und anorgani-

schen Verbindungen "Molekularkomplexe" zu bilden, ist eine bekannte Tatsache und beeinflußt z.B. auch die Zusammensetzung der Niederschläge bei verschiedenen gravimetrischen Chininbestimmungen (s. auch Henry[34] S.18). Eine Molekularverbindung des Chinidinsulfats mit Silbernitrat dürfte somit in diesem Fall vorliegen.

Trotz mehrstündiger Trocknung über Phosphorpentoxid bei 130° und 12 Torr konnte der Niederschlag nicht kristallwasserfrei erhalten werden.

Zusammenfassung.

Die dünnschichtchromatographische Trennung des Chinins von seinen Nebenalkaloiden durch Kombination von Adsorptions- und Verteilungschromatographie wurde beschrieben. Die Methode ließ sich zu einer quantitativen Bestimmung des Chinins aus Chinarinde ausbauen. Die Bestimmungen wurden photometrisch und fluorimetrisch durchgeführt. Die statistische Auswertung der photometrischen Chininbestimmung ergab eine Standardabweichung von

$$s = \pm 3{,}09\ \%\ \text{relat.}$$

Der Streubereich von Einzelmessungen betrug

$$\Delta x = \pm 6{,}19\ \%\ \text{relat.}$$

Der Bestimmungsfehler betrug im Durchschnitt

$$\Delta_{\bar{x}_A} = \pm 0{,}57 \text{ } \gamma \text{ Chinin/ml.}$$

Bei quantitativ dünnschichtchromatographischer Überprüfung der Internationalen Standardmethode zur Chininbestimmung konnte gezeigt werden, daß diese bei niedrigen Chiningehalten in der Droge (≤ 2 %) keine zuverlässigen Ergebnisse mehr liefert. Es stellte sich heraus, daß der chromatographisch ermittelte Chiningehalt der nach der Standardmethode erhaltenen Tartratgemische teilweise stark von dem aufgrund des optischen Drehungswinkels geforderten Tabellenwert abwich, mit dem direkt aus der Droge quantitativ chromatographisch ermittelten hingegen übereinstimmte.

Weiterhin wurden Chinin- und Chinidinpräparate des Handels nach den Vorschriften des DAB 7 untersucht und die physikalischen Konstanten des Arzneibuchs an präparativ schichtchromatographisch gereinigten Basen überprüft. Die Überlegenheit der Präparativen Schichtchromatographie gegenüber anderen Reinigungsmethoden konnte dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden.

Praktischer Teil

1. Umkristallisation der Alkaloidbasen.

1.1. Chininbase.

Substanz wird in Wasser und der notwendigen Menge verdünnter Schwefelsäure (16 %) gelöst. Die Lösung wird in der Siedehitze mit verdünntem Ammoniak (10 %) auf pH 6,5 eingestellt (Tüpfeln gegen Universalindikator-Papier). Das nach dem Erkalten ausgefallene Chininsulfat wird auf einer G_3-Glasfritte abgesaugt, gut mit destilliertem Wasser gewaschen und aus heißem Wasser umkristallisiert. Nach dem Abkühlen werden die Kristalle erneut abgesaugt, gewaschen und in Wasser und wenig verdünnter Schwefelsäure gelöst. Nun wird mit verdünntem Ammoniak in der Kälte die Base ausgefällt, abgesaugt und solange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser gegen Indikatorpapier neutral reagiert. Die noch feuchte Base wird nochmals nach diesem Verfahren behandelt. Nach der 2.Fällung wird die Base gründlich mit Wasser gewaschen und 3 - 5 Tage im Schwefelsäure-Exsikkator bei Raumtemperatur vorgetrocknet, danach über Phosphorpentoxid bei 12 Torr und 115° .

1.2. Chinidinbase.

Substanz wird 3-mal aus absolutem Alkohol umkristallisiert und über Phosphorpentoxid bei 12 Torr und 115° getrocknet.

1.3. Cinchoninbase.

Substanz wird 3-mal aus absolutem Alkohol umkristallisiert und über Phosphorpentoxid bei 12 Torr und 115° getrocknet.

1.4. Cinchonidinbase.

s. Cinchoninbase.

1.5. Hydrochininbase.

s. Chininbase.

1.6. Hydrochinidinbase.

s. Chinidinbase.

2. Qualitative Dünnschichtchromatographie.

2.1. Herstellung der Trägerschicht.

2.1.1. Kieselgel G.

25 g Kieselgel G "Merck" werden mit 50 ml Wasser angeschlämmt und mit dem DESAGA - Streichgerät nach Stahl auf 5 Glasplatten, 20 x 20 cm, in einer Schichtdicke von etwa 0,25 mm ausgestrichen. Chromatographiert wird auf lufttrockenen Platten. Die Chromatogramme werden in allen Fällen bis zum Plattenrand entwickelt.

Zur Herstellung von alkalischen Kieselgelschichten wird das Trägermaterial anstelle von Wasser mit der gleichen Menge 0,1 n-Natronlauge oder Kalilauge angeschlämmt.

2.1.2. Kieselgel HR "Merck":

45 g Kieselgel HR "Merck" werden mit 95 ml Wasser angeschlämmt und mit dem DESAGA - Streichgerät auf 5 Glasplatten, 20 x 20 cm, in einer Schichtdicke von etwa 0,50 mm ausgestrichen.

Zur Herstellung von alkalischen Schichten wird wie bei Kieselgel G verfahren.

2.2. Chromatographiebedingungen.

Von den gereinigten Basen werden 0,5 - 1,0 µl einer 1-proz. Lösung in Äthanol oder Äthanol + Chloroform = 1 + 1 (bei Cinchonin und Cinchonidin) in einem Abstand von 1,5 cm vom unteren Rand einer Trägerplatte aufgetragen (≙ 5 - 10 γ Substanz). Die Fließmittelangaben sind Volumenangaben.

Als Gefäß dient eine mit Filterpapier ausgekleidete Glaswanne mit Schliffdeckel. Die Flüssigkeitsmenge pro Kammer beträgt etwa 100 ml. Nach Kammersättigung wird chromatographiert. Alle Chromatogramme werden bei Raumtemperatur angefertigt.

Die Sichtbarmachung erfolgt durch Betrachten unter UV - Licht (350 nm) und nachfolgendes Besprühen mit Dragendorffs-Reagenz, mod. nach Thies und Reuter, + Jodplateat-Reagenz[1)].

3. Spektroskopie der Alkaloidbasen.

Die UV - Absorption der Basen wurde mit dem ZEISS - Spektralphotometer PMQ 2 gemessen.

Die IR-Spektren wurden mit dem PERKIN-ELMER - Spektralphotometer 221 in Kaliumbromid aufgenommen.

Die Aufnahme der Kernresonanz-Spektren erfolgte mit dem Spektropraphen VARIAN A 60 in Deuterochloroform bzw. Deutero-

Tab. 1 :

Absorptionsspektrum von C h i n i n b a s e

gemessen in Methanol; d = 1,000 cm , c = 10^{-4} molar

Einwaage: 3,2 mg Chininbase (Boehringer) in 100 ml Methanol

Molekulargewicht von Chinin (wasserfrei) = 324,4

λ(nm)	E	ε	log ε	λ(nm)	E	ε	log ε
246	1,02	10200	4.0086	270	0,366	3660	3.5635
246,5	0,890	8900	3.9494	271	0,371	3710	3.5694
247	0,777	7770	3.8904	273	0,380	3800	3.5798
248	0,598	5980	3.7767	275	0,393	3930	3.5944
248,5	0,528	5280	3.7226	276	0,399	3990	3.6010
249	0,467	4670	3.6693	277	0,406	4060	3.6085
250	0,383	3830	3.5832	278	0,413	4130	3.6159
251	0,332	3320	3.5211	279	0,416	4160	3.6191
252	0,302	3020	3.4800	280	0,416	4160	3.6191
252,5	0,291	2910	3.4639	282	0,407	4070	3.6096
253	0,283	2830	3.4518	285	0,384	3840	3.5843
254	0,271	2710	3.4329	287	0,373	3730	3.5717
255	0,270	2700	3.4314	290	0,361	3610	3.5575
256	0,271	2710	3.4330	292	0,343	3430	3.5353
257	0,273	2730	3.4362	293	0,328	3280	3.5159
258	0,277	2770	3.4425	295	0,292	2920	3.4654
260	0,287	2870	3.4579	297	0,261	2610	3.4166
262	0,299	2990	3.4757	298	0,249	2490	3.3962
265	0,323	3230	3.5092	299	0,242	2420	3.3838

. 1 (Forts.)

(nm)	E	ε	log ε	λ(nm)	E	ε	log ε
300	0,237	2370	3.3747	331	0,543	5430	3.7348
301	0,237	2370	3.3747	332	0,551	5510	3.7411
302	0,240	2400	3.3802	333	0,550	5500	3.7404
303	0,242	2420	3.3838	334	0,536	5360	3.7292
305	0,257	2570	3.4099	335	0,508	5080	3.7059
310	0,306	3060	3.4857	340	0,265	2650	3.4232
315	0,397	3970	3.5988	345	0,103	1030	3.0128
317	0,443	4430	3.6464	350	0,034	340	2.5315
318	0,463	4630	3.6656	351	0,026	260	2.4150
319	0,476	4760	3.6776	352	0,021	210	2.3222
320	0,485	4850	3.6857	353	0,015	150	2.1761
321	0,490	4900	3.6902	354	0,011	110	2.0414
322	0,491	4910	3.6911	355	0,008	80	1.9031
323	0,490	4900	3.6902	356	0,007	70	1.8451
324	0,491	4910	3.6911	357	0,005	50	1.6990
325	0,492	4920	3.6920	358	0,003	30	1.4771
326	0,494	4940	3.6940	359	0,002	20	1.3010
327	0,498	4980	3.6972	360	0,002	20	1.3010
328	0,510	5100	3.7076	361	0,001	10	1.000
329	0,516	5160	3.7126	362	0,000	0	---
330	0,530	5300	3.7243				

Tab. 2:

Absorptionsspektrum von C i n c h o n i n b a s e

gemessen in Methanol; d = 1,000 cm, c = 10^{-4} molar

Einwaage: 3,0 mg Cinchoninbase (Boehringer) in 100 ml Methanol

Molekulargewicht von Cinchonin (wasserfrei) = 294,4

λ (nm)	E	ε	log ε	λ (nm)	E	ε	log ε
235	0,880	8800	3.9445	260	0,263	2630	3.4199
236	0,647	6470	3.8110	263	0,314	3140	3.4969
237	0,501	5010	3.6998	265	0,335	3350	3.5250
238	0,415	4150	3.6180	270	0,405	4050	3.6075
239	0,360	3600	3.5563	272	0,428	4280	3.6314
240	0,322	3220	3.5079	273	0,436	4360	3.6395
241	0,296	2960	3.4713	274	0,447	4470	3.6503
242	0,273	2730	3.4362	275	0,455	4550	3.6580
243	0,251	2510	3.3997	276	0,465	4650	3.6674
244	0,230	2300	3.3617	277	0,470	4700	3.6721
245	0,212	2120	3.3263	278	0,477	4770	3.6785
246	0,198	1980	3.2967	279	0,480	4800	3.6812
247	0,190	1900	3.2787	280	0,483	4830	3.6839
248	0,184	1840	3.2648	280,5	0,478	4780	3.6794
249	0,183	1830	3.2624	281	0,485	4850	3.6857
250	0,188	1880	3.2742	282	0,486	4860	3.6866
252	0,199	1990	3.2988	283	0,488	4880	3.6884
255	0,225	2250	3.3522	284	0,488	4880	3.6884

b. 2 (Fortsetzung)

λ(nm)	E	ε	log ε	λ(nm)	E	ε	log ε
285	0,486	4860	3.6866	312	0,191	1910	3.2810
286	0,484	4840	3.6848	313	0,228	2280	3.3579
287	0,482	4820	3.6830	314	0,279	2790	3.4456
288	0,482	4820	3.6830	315	0,300	3000	3.4771
289	0,480	4800	3.6812	316	0,270	2700	3.4314
290	0,472	4720	3.6739	317	0,205	2050	3.3117
291	0,458	4580	3.6609	318	0,146	1460	3.1643
292	0,443	4430	3.6464	319	0,103	1030	3.0128
293	0,428	4280	3.6314	320	0,074	740	2.8692
294	0,415	4150	3.6180	321	0,056	560	2.7482
295	0,401	4010	3.6031	322	0,045	450	2.6532
296	0,384	3840	3.5843	323	0,039	390	2.5911
297	0,365	3650	3.5623	324	0,034	340	2.5315
298	0,349	3490	3.5428	325	0,032	320	2.5051
299	0,341	3410	3.5327	326	0,029	290	2.4624
300	0,348	3480	3.5416	327	0,028	280	2.4472
301	0,361	3610	3.5575	328	0,028	280	2.4472
302	0,360	3600	3.5563	329	0,028	280	2.4472
303	0,343	3430	3.5353	330	0,028	280	2.4472
304	0,320	3200	3.5051	331	0,028	280	2.4472
305	0,297	2970	3.4728	332	0,028	280	2.4472
310	0,201	2010	3.3032				
311	0,188	1880	3.2742				

Tab. 3:

Absorptionssprektrum von C h i n i n b a s e in Methanol/Schwefelsäure

gemessen in 70 % igem Methanol + 10 % verd. Schwefelsäure DAB 6

Einwaage: 2,97 mg Chininbase (Buchler) in 100 ml Methanol/Schwefelsäure

Molekulargewicht von Chinin (wasserfrei) = 324,4

d = 1,000 cm, c = $9 \cdot 10^{-5}$ molar

λ(nm)	E	ε	log ε	λ(nm)	E	ε	log ε
260	1,060	11778	4.07108	284	0,112	1244	3.09482
262	0,710	7889	3.89702	287	0,130	1444	3.15957
264	0,451	5011	3.69992	290	0,151	1677	3.22453
265	0,353	3922	3.59351	293	0,175	1944	3.28870
267	0,216	2400	3.38021	296	0,201	2233	3.34889
269	0,138	1533	3.18554	300	0,240	2666	3.42586
270	0,114	1266	3.10243	303	0,274	3044	3.48344
272	0,086	955	2.98000	306	0,300	3333	3.52284
273	0,080	889	2.94890	308	0,322	3577	3.55352
274	0,077	855	2.93197	310	0,339	3766	3.57588
275	0,077	855	2.93197	312	0,355	3944	3.59594
276	0,078	866	2.93752	314	0,366	4066	3.60917
277	0,078	866	2.93752	315	0,372	4133	3.61627
278	0,083	922	2.96473	316	0,376	4177	3.62086
280	0,092	1022	3.00945	317	0,380	4222	3.62552
282	0,101	1122	3.04999	318	0,383	4255	3.62890

Tab. 3 (Forts.)

λ(nm)	E	ε	log ε	λ(nm)	E	ε	log ε
320	0,385	4277	3.63114	352	0,517	5744	3.75921
323	0,384	4266	3.63002	353	0,512	5689	3.75504
325	0,380	4222	3.62552	354	0,505	5611	3.74904
326	0,385	4277	3.63114	355	0,497	5522	3.74210
327	0,388	4311	3.63458	357	0,478	5311	3.72518
328	0,387	4300	3.63347	360	0,438	4866	3.68717
329	0,390	4333	3.63679	363	0,388	4311	3.63458
330	0,396	4400	3.64345	365	0,350	3889	3.58984
332	0,417	4633	3.66586	370	0,252	2800	3.44716
335	0,444	4933	3.69311	373	0,197	2189	3.34025
338	0,475	5277	3.72239	376	0,150	1666	3.22167
340	0,491	5455	3.73679	378	0,123	1366	3.13545
342	0,506	5622	3.74989	380	0,098	1089	3.03703
343	0,512	5689	3.75504	382	0,080	889	2.94890
344	0,515	5722	3.75755	384	0,063	700	2.84510
345	0,520	5777	3.76170	386	0,050	555	2.74429
346	0,523	5811	3.76425	388	0,038	422	2.62531
347	0,523	5811	3.76425	390	0,029	322	2.50786
348	0,525	5833	3.76589	393	0,020	222	2.34635
349	0,525	5833	3.76589	395	0,015	166	2.22011
350	0,523	5811	3.76425	398	0,009	100	2.00000
351	0,520	5777	3.76170	400	0,006	66	1.81954

Tab. 4:

Absorptionsspektrum von C i n c h o n i n in Methanol/Schwefelsäure

gemessen in 70 % igem Methanol + 10 % verd. Schwefelsäure DAB 6

Einwaage: 2,13 mg Cinchonin pur.(Boehringer) in 100 ml Methanol/H_2SO_4

Molekulargewicht von Cinchonin (wasserfrei) = 294,4

d = 1,000 cm, c = $7 \cdot 10^{-5}$ molar

λ(nm)	E	ε	log ε	λ(nm)	E	ε	log ε
250	0,198	2828	3.45148	268	0,062	885	2.94694
252	0,137	1957	3.29159	270	0,066	942	2.97405
254	0,106	1514	3.18013	272	0,072	1028	3.01199
255	0,096	1371	3.13704	274	0,079	1128	3.05231
256	0,086	1228	3.08920	276	0,088	1257	3.09934
257	0,082	1171	3.06856	278	0,099	1414	3.15045
258	0,077	1100	3.04139	280	0,113	1614	3.20790
259	0,071	1014	3.00604	283	0,140	2000	3.30103
260	0,070	1000	3.00000	285	0,155	2214	3.34518
261	0,069	985	2.99344	288	0,188	2685	3.42894
262	0,067	957	2.98091	290	0,210	3000	3.47712
263	0,064	914	2.96095	295	0,279	3985	3.60043
264	0,063	900	2.95424	300	0,355	5071	3.70509
265	0,063	900	2.95424	305	0,434	6200	3.79239
266	0,062	885	2.94694	308	0,473	6757	3.82975
267	0,062	885	2.94694	310	0,494	7057	3.84862

Tab. 4 (Forts.)

λ (nm)	E	ε	log ε	λ (nm)	E	ε	log ε
311	0,503	7185	3.85643	325	0,332	4742	3.67596
312	0,510	7285	3.86243	328	0,265	3785	3.57807
313	0,518	7400	3.86923	330	0,234	3343	3.52414
314	0,520	7428	3.87087	335	0,168	2400	3.38021
315	0,523	7471	3.87338	340	0,111	1587	3.20058
316	0,522	7457	3.87256	345	0,064	914	2.96095
317	0,520	7428	3.87087	350	0,033	471	2.67302
318	0,517	7385	3.86835	355	0,015	214	2.33041
319	0,495	7071	3.84948	360	0,006	85	1.92942
320	0,473	6757	3.82975	370	0,003	43	1.63347
323	0,386	5514	3.74147	380	0,002	28	1.44716

4. Reinigungsmethoden für Chinin, Chinidin, Hydrochinin und Hydrochinidin.

4.1. Quecksilberacetatmethode:

1 g Substanz (Base oder Salz) werden in 6 g 10-proz. Schwefelsäure gelöst und mit 14 g einer 10-proz. Quecksilberacetatlösung (in 5-proz. Essigsäure) 4 Stunden auf 40 - 50° erwärmt. Nach dem Erkalten werden 10 g 10-proz. Ammoniak hinzugefügt, anschließend 1-mal mit 20 ml und 2-mal mit 10 ml Äther ausgeschüttelt. Die ätherischen Auszüge werden mit Wasser gewaschen, der Äther abdestilliert und der Rückstand bei 105° getrocknet (= Äthylbase). Die ausgeätherte Lösung wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit 0,5 g phosphoriger Säure versetzt und kurze Zeit zum Sieden erwärmt. Das abgeschiedene Quecksilber wird abfiltriert und aus dem Filtrat mit verdünntem Ammoniak die Vinylbase ausgefällt. Die Base wird ausgeäthert, der Äther vorsichtig verdunstet und die Vinylbase anschließend umkristallisiert wie auf S.111beschrieben (Reinigung der Basen durch Umkristallisieren).

Bei den schwer in Äther löslichen Alkaloiden, wie z. B. Cinchonin, Hydrocinchonin und Hydrocinchonidin, wird der Niederschlag auf der Filternutsche abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

4.2. Präparative Schichtchromatographie:

Aus 400 g Kieselgel PF_{254} und 900 ml Wasser wird in einem Rundkolben durch Schütteln eine homogene Suspension bereitet.

Von dieser Suspension werden je 180 ml auf Glasplatten 40 x 20 cm ausgegossen (90 ml für 20 x 20 cm Platten) und mit einem Glasstab gleichmäßig ausgestrichen. Die Suspension reicht für 6 Platten, 40 x 20 cm, oder 12 Platten 20 x 20 cm. Die Platten werden anschließend vorsichtig und schonend bei Raumtemperatur getrocknet. Ungleichmäßige und plötzliche Wärmeeinwirkung sowie Sonnenbestrahlung sind zu vermeiden, da Risse in der trockenen Schicht entstehen. Die an der Luft gut abgetrockneten Platten können direkt zur Chromatographie verwendet werden, Aktivierung ist nicht erforderlich. Auf die lufttrockenen Platten werden 0,2 - 0,4 g Substanz (ca. 1 - 2 ml einer 20-proz. Lösung der Basen in Chloroform) bandförmig in einem Abstand von 1,5 cm vom unteren Rand aufgetragen; anschließend entwickelt man mit dem Laufmittel Methyläthylketon : Methanol : Wasser = 2 : 1 : 1.
Bereits nach 2-maliger Entwicklung läßt sich bei Handelspräparaten eine Auftrennung in 2 Bänder erkennen. Die Gesamtlaufzeit beträgt ca. 3 Stunden.

Auf den lufttrockenen Platten werden anschließend unter UV-Licht die entsprechenden Zonen markiert und mit einem Spatel abgeschabt. Das Kieselgel wird nun 4 - 5 Stunden am Soxhlet mit Methanol + 2,5 % Ammoniak extrahiert.

Das Eluat wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt, der Rückstand in Benzol aufgenommen und heiß filtriert. Chininbase wird abweichend von der Vorschrift auf S.111 aus Benzol umkristallisiert und über Phosphorpentoxid bei 12 Torr und 125° getrocknet; ebenso behandelt wird Hydrochinin. Chinidin und Hydrochinidin werden umkristallisiert und getrocknet wie auf S.111 beschrieben.

Tab. 5: Schmelzpunkte der nach der Quecksilberacetatmethode gereinigten Basen

Substanz	Kapillarmethode	Metallblock nach DAB 7	Schmelzpunkt-Mikroskop "LEITZ"
Chininbase	176,0-177,5°	176,7-177,2° = 177,5° k	177,0 - 178,5°
Chinidinbase	173,0-174,0°	173,6-173,8° = 174,2° k	175,0 - 176,0°
Hydrochininbase	174,0-174,5°	172,3-173,6° = 173,8° k	174,5 - 175,5°
Hydrochinidinbase	171,0°	171,5-172,0° = 172,1° k	172,0 - 173,0°

5. Analysenverfahren.

5.1. Internationale Standardmethode.

In einem Becherglas werden 10 g mittelfein gepulverte Rinde mit 3 g staubförmigem gelöschtem Kalk und 9 ml 5-proz. Natronlauge so lange gemischt, bis die Masse gleichmäßig durchfeuchtet ist. Nach einstündigem Stehen im Becherglas bei gelegentlichem Umrühren wird die Mischung in eine Papierhülse gefüllt und im Soxhletapparat mit 75 - 100 ml Benzol extrahiert. Die Extraktionsdauer beträgt 2 Stunden. Danach wird der Benzolextrakt am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand in 5,00 ml n-Salzsäure und 15 ml Wasser aufgenommen. Den Rest des Benzols entfernt man durch Erwärmen auf

dem Wasserbad. Man filtriert in ein Becherglas und spült mit soviel Wasser nach, daß das Filtrat 40 ml beträgt. Nun wird in der Wärme der Gesamtalkaloidgehalt mit n-Natronlauge gegen Methylrot titriert (Feinbürette), die austitrierte Lösung auf dem Wasserbad auf 25 ml eingeengt und von evtl. ausgeschiedenen Flocken abfiltriert.

Anschließend werden 5 ml einer mit Weinsäure gegen Lackmus neutralisierten, 40-proz. Natriumtartratlösung hinzugefügt, genau auf 25,0 ml eingedampft und 12 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Die ausgeschiedenen L-Tartrate des Chinins und Cinchonidins werden in einem konstant gewogenen Filtertiegel abgesaugt und mit dem Filtrat, zum Schluß mit wenig Wasser (max. 12 ml), gewaschen. Die Gesamtmenge der Waschflüssigkeit wird genau gemessen. Der Niederschlag wird bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Von dem getrockneten Niederschlag werden 0,5000 g in 3,75 ml n-Salzsäure gelöst, die Lösung auf 25,00 ml aufgefüllt und im 200 mm-Rohr bei Natriumlicht polarisiert.

5.1.1. Berechnung des Gesamtalkaloidgehalts:

$$\frac{(5{,}00 \cdot F_{HCl} - n) \cdot 0{,}31 \cdot 100}{E}$$

n = ml n-Natronlauge

E = Einwaage in g

5.1.2. Berechnung des Chiningehalts:

Vor der Berechnung des Chiningehalts müssen das Gewicht des Tartratniederschlags und der abgelesene Drehungswinkel

TABLES POUR LA DETERMINATION DE LA TENEUR EN QUININE D'APRES LA MESURE POLARIMETRIQUE

(Extrait de Mededeelingen van het Kina Proefstation - N° 1.
« De Analyse van Kinabast » door Dr. J. W. COMMELIN - Batavia. 1912 - gedrukt bij G. Kolff & Co.)

Déviations polarimétriques corrigées (degrés-min.)	Poids de bases anhydres par gramme de tartrates stables à 110° C	
	Quinine	Cinchonidine
8°51	0,7941	0,0000
8°50	0,7902	0,003944
8°49	0,7861	0,007878
8°48	0,7823	0,01182
8°47	0,7784	0,01576
8°46	0,7745	0,01962
8°45	0,7705	0,02367
8°44	0,7665	0,02761
8°43	0,7626	0,03155
8°42	0,7588	0,03549
8°41	0,7548	0,03944
8°40	0,7508	0,04338
8°39	0,7469	0,04733
8°38	0,7430	0,05126
8°37	0,7391	0,05521
8°36	0,7350	0,05916
8°35	0,7311	0,06310
8°34	0,7273	0,06704
8°33	0,7233	0,07099
8°32	0,7194	0,07494
8°31	0,7155	0,07886
8°30	0,7115	0,08281
8°29	0,7076	0,08676
8°28	0,7037	0,09069
8°27	0,6997	0,09464
8°26	0,6958	0,09858
8°25	0,6918	0,1025
8°24	0,6879	0,1065
8°23	0,6839	0,1104
8°22	0,6800	0,1144
8°21	0,6761	0,1183
8°20	0,6722	0,1223
8°19	0,6682	0,1262
8°18	0,6643	0,1301
8°17	0,6604	0,1341
8°16	0,6564	0,1380
8°15	0,6525	0,1420
8°14	0,6486	0,1459
8°13	0,6446	0,1498
8°12	0,6407	0,1538
8°11	0,6368	0,1578
8°10	0,6328	0,1617
8°09	0,6290	0,1656
8°08	0,6250	0,1696
8°07	0,6212	0,1736
8°06	0,6172	0,1774
8°05	0,6132	0,1814

Déviations polarimétriques corrigées (degrés-min.)	Poids de bases anhydres par gramme de tartrates stables à 110° C	
	Quinine	Cinchonidine
8°04	0,6092	0,1854
8°03	0,6053	0,1892
8°02	0,6015	0,1932
8°01	0,5974	0,1972
8°00	0,5936	0,2011
7°59	0,5896	0,2050
7°58	0,5857	0,2090
7°57	0,5819	0,2129
7°56	0,5779	0,2169
7°55	0,5740	0,2209
7°54	0,5701	0,2248
7°53	0,5661	0,2288
7°52	0,5620	0,2327
7°51	0,5582	0,2367
7°50	0,5543	0,2405
7°49	0,5503	0,2445
7°48	0,5464	0,2484
7°47	0,5425	0,2524
7°46	0,5386	0,2564
7°45	0,5346	0,2602
7°44	0,5307	0,2642
7°43	0,5267	0,2681
7°42	0,5229	0,2720
7°41	0,5188	0,2761
7°40	0,5150	0,2800
7°39	0,5110	0,2839
7°38	0,5071	0,2878
7°37	0,5031	0,2918
7°36	0,4992	0,2958
7°35	0,4953	0,2997
7°34	0,4914	0,3037
7°33	0,4874	0,3076
7°32	0,4835	0,3116
7°31	0,4796	0,3158
7°30	0,4756	0,3198
7°29	0,4716	0,3238
7°28	0,4677	0,3273
7°27	0,4638	0,3313
7°26	0,4599	0,3352
7°25	0,4560	0,3391
7°24	0,4521	0,3431
7°23	0,4481	0,3470
7°22	0,4442	0,3510
7°21	0,4402	0,3549
7°20	0,4363	0,3588
7°19	0,4324	0,3628
7°18	0,4285	0,3667

Déviations polarimétriques corrigées (degrés-min.)	Poids de bases anhydres par gramme de tartrates stables à 110° C	
	Quinine	Cinchonidine
7°17	0,4245	0,3707
7°16	0,4207	0,3746
7°15	0,4167	0,3786
7°14	0,4128	0,3825
7°13	0,4088	0,3865
7°12	0,4049	0,3904
7°11	0,4010	0,3944
7°10	0,3970	0,3983
7°09	0,3931	0,4023
7°08	0,3891	0,4061
7°07	0,3852	0,4102
7°06	0,3814	0,4141
7°05	0,3774	0,4180
7°04	0,3735	0,4220
7°03	0,3695	0,4259
7°02	0,3656	0,4298
7°01	0,3616	0,4338
7°00	0,3577	0,4377
6°59	0,3538	0,4417
6°58	0,3498	0,4457
6°57	0,3459	0,4495
6°56	0,3420	0,4535
6°55	0,3381	0,4575
6°54	0,3341	0,4614
6°53	0,3302	0,4654
6°52	0,3263	0,4692
6°51	0,3223	0,4733
6°50	0,3184	0,4772
6°49	0,3145	0,4811
6°48	0,3106	0,4851
6°47	0,3066	0,4890
6°46	0,3027	0,4929
6°45	0,2987	0,4969
6°44	0,2948	0,5008
6°43	0,2909	0,5048
6°42	0,2869	0,5088
6°41	0,2830	0,5126
6°40	0,2791	0,5166
6°39	0,2752	0,5206
6°38	0,2712	0,5245
6°37	0,2673	0,5284
6°36	0,2634	0,5323
6°35	0,2594	0,5363
6°34	0,2555	0,5403
6°33	0,2516	0,5443
6°32	0,2477	0,5481
6°31	0,2437	0,5521
6°30	0,2397	0,5561
6°29	0,2359	0,5601
6°28	0,2319	0,5639
6°27	0,2280	0,5679
6°26	0,2241	0,5719
6°25	0,2202	0,5758
6°24	0,2163	0,5797
6°23	0,2122	0,5837

Déviations polarimétriques corrigées (degrés-min.)	Poids de bases anhydres par gramme de tartrates stables à 110° C	
	Quinine	Cinchonidine
6°22	0,2084	0,5876
6°21	0,2044	0,5916
6°20	0,2004	0,5955
6°19	0,1965	0,5994
6°18	0,1926	0,6034
6°17	0,1887	0,6073
6°16	0,1848	0,6112
6°15	0,1808	0,6151
6°14	0,1769	0,6191
6°13	0,1730	0,6232
6°12	0,1680	0,6270
6°11	0,1651	0,6310
6°10	0,1612	0,6349
6°09	0,1572	0,6389
6°08	0,1533	0,6428
6°07	0,1494	0,6468
6°06	0,1454	0,6507
6°05	0,1416	0,6546
6°04	0,1376	0,6586
6°03	0,1337	0,6625
6°02	0,1297	0,6665
6°01	0,1258	0,6704
6°00	0,1219	0,6744
5°59	0,1180	0,6782
5°58	0,1140	0,6822
5°57	0,1101	0,6861
5°56	0,1061	0,6901
5°55	0,1022	0,6940
5°54	0,098336	0,6981
5°53	0,094434	0,7020
5°52	0,090540	0,7060
5°51	0,086648	0,7099
5°50	0,082754	0,7139
5°49	0,078861	0,7178
5°48	0,074969	0,7218
5°47	0,071076	0,7256
5°46	0,066682	0,7297
5°45	0,062780	0,7335
5°44	0,058886	0,7374
5°43	0,054993	0,7415
5°42	0,051099	0,7454
5°41	0,047218	0,7494
5°40	0,043324	0,7532
5°39	0,039431	0,7571
5°38	0,035538	0,7612
5°37	0,031645	0,7650
5°36	0,027752	0,7690
5°35	0,023999	0,7731
5°34	0,019966	0,7769
5°33	0,015972	0,7809
5°32	0,011180	0,7848
5°31	0,007861	0,7886
5°30	0,003931	0,7927
5°29		0,7968

korrigiert werden. Die Korrekturfaktoren sind auf die in der Originalvorschrift geforderten Einheitsbedingungen bei 17° C bezogen.

5.1.2.1. Tartratniederschlag.

Die Löslichkeitskorrektur beträgt für je 50 ml Filtrat = 25 mg Tartrat.

Die Korrektur für gelöste Tartrate bei 17° beträgt

$25 \cdot 0{,}02 \cdot (t - 17)$ mg Tartrat.

t = Temperatur während der Filtration des Niederschlags.

Beide Korrekturen werden zum Tartratgewicht hinzuaddiert.

5.1.2.2. Polarisation.

Die Korrektur für die Drehung bei 17° C beträgt

$0{,}82 \cdot (t' - 17)$ Minuten.

t' = Temperatur, bei der der Drehungswinkel gemessen wurde.

Die Korrektur wird zu dem erhaltenen Drehungswinkel hinzuaddiert. Mit dem korrigierten Drehungswinkel wird aus vorstehender Tabelle der Faktor für Chininbase entnommen und der Chiningehalt in der lufttrockenen Droge wie folgt berechnet:

$$\frac{100 \cdot \text{korr. Tartratgewicht} \cdot F_{\text{Chinin}} \text{ für korr. Drehungswinkel}}{E} =$$

% - gehalt Chinin in der lufttrockenen Droge

5.2. Quantitative dünnschichtchromatographische Bestimmung der nach der Internationalen Standardmethode erhaltenen Tartrate.

Von dem getrockneten Tartratniederschlag werden 100 - 250 mg, genau gewogen, in einem Scheidetrichter in 1 n- Salzsäure gelöst. Aus der salzsauren Lösung werden mit etwa 5 ml 5-proz. Natronlauge die freien Basen ausgefällt und 3 - 4-mal mit je 5 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wird auf dem Wasserbad eingeengt und im Meßkölbchen auf 10,00 ml aufgefüllt. Nach dem Temperieren bei 20° wird von der Lösung mit einer Kolben-Mikrometerspritze ein aliquoter Anteil (etwa 36 µl - 54 µl) auf alkalische Kieselgel HR - Platten, 0,5 mm Schichtdicke, aufgetragen und durch Umkehrentwicklung in der auf S.131 beschriebenen Fließmittelkombination aufgetrennt. Die Chininzonen werden anschließend ausgekratzt und über Mikrosäulen mit ammoniakalischem Methanol eluiert. Von dem auf 10,00 ml aufgefüllten Eluat wird im Spektralphotometer die Extinktion gegen eine in gleicher Weise behandelte Kieselgel-Blindprobe gemessen. Aus der Eichkurve für Chininbase wird die zugehörige Konzentration c in γ/ml abgelesen. Der Chiningehalt im Tartratgemisch berechnet sich dann folgendermaßen:

$$\frac{c \cdot 100}{\text{auf DC-platte aufgetragenes Vol.i. µl}} = \text{Gehalt an Chininbase in mg/10,00 ml Chloroform}$$

Der Chiningehalt im chromatographierten Tartratgemisch nach der Standardmethode berechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{Chiningehalt der lufttrockenen Droge in \% } \cdot \text{ Tartrateinwaage}}{\text{Gesamt-Tartratauswaage (aus 10 g Droge) } \cdot 10}$$

5.3. DC - Methode zur Bestimmung des Chiningehalts in Chinarinden.

1,250 g fein gepulverte Droge werden in einem 200 ml-Jodzahlkolben mit 2,0 ml Ameisensäure (25-proz.) und 15,0 ml Wasser versetzt und 30 Minuten lang im Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten in Eiswasser setzt man gleichfalls in Eiswasser gekühlte 20,0 g Chloroform, 40,0 g Äther und eine Lösung von 1,50 g Natriumhydroxid in 2,5 ml Wasser zu und schüttelt 10 Minuten lang unter häufigem Eintauchen in Eiswasser kräftig durch. Hierauf läßt man unter gelegentlichem Umschütteln 30 Minuten lang in Eiswasser stehen, fügt dann 2,0 g gepulverten Tragant hinzu und schüttelt bis zur vollständigen Bindung der wäßrigen Phase. Man filtriert die Äther-Chloroform-Lösung durch ein trockenes Faltenfilter, das während der Filtration bedeckt gehalten wird. Das Filtrat wird in einen Kolben eingewogen (48 g Filtrat entsprechen 1 g Droge) und das Lösungsmittel auf dem Wasserbad vorsichtig abdestilliert.

Der Rückstand wird in 10,0 ml Äthanol (90-proz.) unter schwachem Erwärmen gelöst und mit Hilfe eines Glasstabes

auf eine Säule von 5,0 g Aluminiumoxid ("neutral", Akt. Stufe I) gebracht, die zuvor trocken in ein mit einem Wattebausch fest verschlossenes Chromatographierrohr von 1,7 cm Durchmesser eingefüllt wurden. Nach Eindringen der Lösung in die Säule werden Kolben, Glasstab und Chromatographierrohr 4-mal mit je 5,0 ml Äthanol (90-proz.) gewaschen in der Weise, daß die neue Waschflüssigkeit immer erst dann auf die Säule gegeben wird, wenn die bisherige Menge gerade eingezogen ist. Anschließend wird noch 3-mal in gleicher Weise mit je 10,0 ml Äthanol (90-proz.) eluiert. Ein Trockenwerden des oberen Teils der Säule ist beim Waschen und Eluieren zu vermeiden. Das Eluat wird in einem 100 ml-Becherglas aufgefangen, die Spitze des Chromatographierrohrs mit etwas Äthanol abgespült und die Lösung auf dem Wasserbad auf etwa 5 ml eingeengt. Das eingeengte Filtrat überführt man anschließend in ein 10,00 ml Meßkölbchen und spült das Becherglas gut mit Äthanol (90-proz.) aus. Man temperiert bei 20° und füllt zur Marke auf.

5.3.1. Chininbestimmung:

Von der temperierten Extraktlösung werden mit der Mikrometer-Dosierspritze aliquote Anteile auf alkalische Kieselgel HR - Platten, 0,5 mm Schichtdicke, aufgetragen. Das Auftragsvolumen richtet sich nach dem zu erwartenden Chiningehalt der Droge. Bei einem Gehalt von $<$ 2 % Chininbase werden 72 - 90 µl (= 400 - 500 Teilstriche der Mikrometerspritze), bei Gehalten von 2 % - 6 % 54 - 72 µl (= 300 - 400 Teilstriche) und bei $>$ 6 % ein Volumen von 36 - 54 µl (= 200 -

300 Teilstriche) aufgetragen. Eine zu starke Diffusion des Startfleckens während des Auftragens ist zu vermeiden, sein Durchmesser soll etwa 1 cm betragen. In gleicher Weise wird daneben eine Lösung von Chininbase in Chloroform als Vergleichssubstanz aufgetropft. Nun wird die DC - Platte nach dem Umkehrprinzip entwickelt, und zwar zuerst mit dem Fließmittel

Methyläthylketon : Methanol : Wasser = 3 : 1 : 0,5;

danach wird die Platte an der Luft getrocknet und in entgegengesetzter Richtung mit dem Fließmittel

Chloroform : Aceton : Diäthylamin = 5 : 4 : 1

entwickelt. Mit beiden Laufmittelsystemen wird jeweils bis zum Plattenrand chromatographiert. Nach dem Trocknen an der Luft wird das Chromatogramm unter der UV-Lampe (350 nm) betrachtet und die Chininzone des Drogenextraktes, die anhand der Vergleichssubstanz erkennbar ist, mit einer Nadel markiert. Mit einem Objektträger schabt man diese Zone auf Pergamentpapier und schichtet das Kieselgel in die nachstehend beschriebene Mikro-Chromatographierröhre. Die Glasröhre wird zuvor mit einem Wattebausch verschlossen und dieser mit einer 2 - 3 mm hohen, mit Wasser leicht angefeuchteten Schicht von Linterspulver 124 zur Säulenchromatographie (Macherey und Nagel) bedeckt. Anschließend eluiert man mit 9,0 ml Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.) direkt in 10,00 ml Meßkölbchen, temperiert und füllt mit Methanol/Ammoniak zur Marke auf. Im Spektralphotometer mißt man nun die Extinktion des Eluats bei 332 nm und liest an der Eichkurve die zugehörige Konzen-

tration an Chininbase in γ /ml ab. Aus der gemessenen Konzentration berechnet sich der Chiningehalt in der getrockneten Droge wie folgt:

$$\frac{c \cdot 48 \cdot 1000}{v \cdot e \cdot (100{,}00 - b)} = \text{\%-gehalt Chininbase in der getrockneten Droge}$$

Es bedeuten:

c = gefundene Chininmenge in γ /ml

v = auf die DC-Platte aufgetragenes Volumen in µl

e = ausgewogenes Äther/Chloroformfiltrat
(48 g Äther/Chloroformfiltrat entsprechen 1 g Droge)

b = Trocknungsverlust der Droge in %

5.3.2. Gesamtalkaloidbestimmung:

Zu der verbliebenen Drogenextrakt-Lösung werden 10 ml ausgekochtes und wieder abgekühltes Wasser und 0,5 ml Methylrotlösung hinzugefügt und mit 0,1 n- Salzsäure bis zum beginnenden Farbumschlag titriert (Feinbürette). Nach erneutem Zusatz von 50 ml ausgekochtem und wieder abgekühltem Wasser wird bis zum Umschlag nach Rot titriert. Der Gesamtalkaloidgehalt in der getrockneten Droge berechnet sich wie folgt:

$$\frac{a \cdot F_{Säure} \cdot 32{,}44 \cdot 48 \cdot 100}{(10{,}00 - v) \cdot e \cdot (100{,}00 - b)} = \text{Gesamtalkaloidgehalt in getrockneter Droge in \%}$$

Es bedeuten:

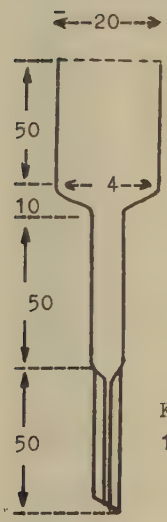
a = Verbrauch an 0,1 n- Salzsäure in ml

e = ausgewogenes Äther/Chloroformfiltrat

b = Trocknungsverlust der Droge in %

v = für die Chininbestimmung verbrauchtes Volumen in ml

Mikrochromatographierrohr zur Elution des Chinins



Kapillarrohr
1 mm ø

6. Bestimmung der Spezifischen Drehung der präparativ schichtchromatographisch gereinigten Basen.

6.1.1. Chininbase, wasserfrei, aus Benzol kristallisiert.

E = 0,3750 g/25,00 ml (c=1,5); l = 20 cm; absoluter Alkohol

Hauptwerte

318,90
318,93
318,93
318,94
318,92
318,99
319,00
318,96
318,95
318,97
318,98
318,92
318,91
318,88
318,92
319,00
318,92
318,92
318,90
318,99
319,00
318,96
+ 318,99

318,95 ($\bar{x}$)

$s = \pm 0{,}037^{\circ}$

$\Delta x = \pm 0{,}076^{\circ}$ (P=95%)

$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}016^{\circ}$ (P=95%)

323,93
- 318,95

$4{,}98^{\circ}$ (α)

Blindwerte

323,93
323,90
323,95
324,00
323,95
323,90
323,96
323,85
323,88
323,89
323,94
323,95
324,00
323,97
323,92
323,91
323,91
323,91
323,94
323,88
323,93
323,95
324,00
323,89
323,88
323,96
323,93
323,94
323,96
323,92
+ 323,88

323,93 ($\bar{x}$)

$s = \pm 0{,}038^{\circ}$

$\Delta x = \pm 0{,}077^{\circ}$ (P=95 %)

$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}014^{\circ}$ (P=95 %)

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{4{,}98 \cdot 1000}{1{,}50 \cdot 20}$$

$$[\alpha]_D^{20} = -166^{\circ} \pm 1^{\circ}$$

==========

6.1.2. Kontrollbestimmung von Chininbase, präparativ schichtchromatographisch gereinigt, aus Benzol umkristallisiert und getrocknet. Die wasserfreie Base wurde anschließend in verdünnter Schwefelsäure gelöst, mit verdünntem Ammoniak ausgefällt und über Blaugel bis zu einem Feuchtigkeitsgehalt von 1,55 % getrocknet.

Einwaage: 0,75010 g Chininbase/ 50,00 ml (c=1,5); l = 20 cm; absoluter Alkohol;

Hauptwerte		Blindwerte	
188,69	$s = \pm 0{,}054^{\circ}$	193,71	$s = \pm 0{,}032^{\circ}$
188,79		193,71	
188,79	$\Delta x = \pm 0{,}113^{\circ}$ (P=95 %)	193,73	$\Delta x = \pm 0{,}067^{\circ}$ (P=95%)
188,78		193,69	
188,85	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}025^{\circ}$ (P=95 %)	193,69	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}015^{\circ}$ (P=95%)
188,79		193,67	
188,65		193,70	
188,76		193,69	
188,83		193,63	
188,79		193,69	
188,76	193,69	193,69	
188,78	-188,79	193,65	
188,78		193,70	
188,79	$4{,}90^{\circ}$ (α)	193,65	
188,88		193,71	
188,82		193,74	
188,78		193,67	
188,86		193,62	
188,85		193,72	
+188,75		+193,67	
188,79 ($\bar{x}$)		193,69 ($\bar{x}$)	

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l} = \frac{4{,}90 \cdot 1000}{1{,}50 \cdot 20}$$

$\left[\alpha\right]_D^{20} = -163{,}33^{\circ} \pm 1{,}3^{\circ}$; entspricht einem Gehalt der wasserfreien Base von

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = -165{,}90^{\circ}$$

6.2. Chininhydrochlorid:

Hergestellt aus Chininbase durch Zusatz einer äquimolaren Menge Salzsäure.

E = 0,44943 g Chininbase/25,00 ml; Zusatz von 1,385 + 2,450 ml n-Salzsäure, mit Wasser aufgefüllt (c=2,0); l = 20 cm;

Hauptwerte

314,23	$s = \pm 0{,}048^{\circ}$	
314,20		
314,29	$\Delta x = \pm 0{,}105^{\circ}$ (P=95 %)	
314,13		
314,17	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}029^{\circ}$ (P=95 %)	
314,22		
314,19		
314,24		
314,14		
314,24		
314,25	324,33	
314,17	-314,21	
+314,26		
	$10{,}12^{\circ}$ (α)	
314,21 ($\bar{x}$)		

Blindwerte

324,24	$s = \pm 0{,}039^{\circ}$	
324,35		
324,29	$\Delta x = \pm 0{,}082^{\circ}$ (P=95 %)	
324,29		
324,27	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}020^{\circ}$ (P=95 %)	
324,35		
324,34		
324,35		
324,35		
324,37		
324,38		
324,33		
324,30		
324,32		
324,39		
324,34		
324,35		
+324,34		
324,33 ($\bar{x}$)		

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{10{,}12 \cdot 1000}{2{,}00 \cdot 20}$$

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = -253^{\circ} \pm 1{,}2^{\circ}$$

6.3. Chininsulfat:

Hergestellt aus Chininbase durch Zusatz einer äquimolaren Menge Schwefelsäure.

E = 0,43434 g Chininbase/25,00 ml; Zusatz von 13,620 ml 0,1 n-Schwefelsäure (F=1,0172) + 2,630 ml 1 n-Salzsäure (F=1,0735), mit Wasser aufgefüllt (c=2,0); l = 20 cm;

Hauptwerte

314,08		$s = \pm 0,045^{\circ}$
314,07		
314,03	Δx	$= \pm 0,097^{\circ}$ (P=95 %)
314,14		
314,10	$\Delta \bar{x}$	$= \pm 0,026^{\circ}$ (P=95 %)
314,19		
314,14		
314,15		
314,09		
314,08		323,91
314,08		- 314,11
314,07		
314,18		$9,80^{\circ}$ (α)
314,12		
+314,08		
314,11	($\bar{x}$)	

Blindwerte

323,93		$s = \pm 0,018^{\circ}$
323,91		
323,90	Δx	$= \pm 0,040^{\circ}$ (P=95 %)
323,89		
323,93	$\Delta \bar{x}$	$= \pm 0,013^{\circ}$ (P=95 %)
323,90		
323,93		
323,88		
323,92		
+323,92		
323,91	($\bar{x}$)	

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{9,80 \cdot 1000}{2,00 \cdot 20}$$

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = -245^{\circ} \pm 1^{\circ}$$

==========

6.4. Chinidinbase:

E = 1,4400 g/100,00 ml (c=1,5); l = 20 cm; absoluter Alkohol

Hauptwerte		Blindwerte	
26,23	$s = \pm 0{,}036^{\circ}$	18,54	$s = \pm 0{,}030^{\circ}$
26,26		18,47	
26,17	$\Delta x = \pm 0{,}080^{\circ}$ (P=95%)	18,53	$\Delta x = \pm 0{,}068^{\circ}$ (P=95 %)
26,14		18,49	
26,17	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}023^{\circ}$ (P=95%)	18,53	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}020^{\circ}$ (P=95 %)
26,16		18,50	
26,21		18,45	
26,23		18,55	
26,23	26,20	18,50	
26,17	-18,51	18,50	
26,20		+18,52	
+26,21	$7{,}69^{\circ}$ (α)		
26,20 ($\bar{x}$)		18,51 ($\bar{x}$)	

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{7{,}69 \cdot 1000}{1{,}44 \cdot 20}$$

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = +\ 267^{\circ} \pm 1{,}5^{\circ}$$

6.5. Chinidinsulfat:

Hergestellt aus Chinidinbase.

E = 0,86870 g Chinidinbase/50,00 ml; Zusatz von 2,678 ml 1 n-Schwefelsäure + 4,900 ml 1 n-Salzsäure, mit Wasser aufgefüllt (c=2,0); l = 20 cm;

Hauptwerte

33,94
33,96
33,98
33,93
33,93
33,97
33,93
33,98
33,95
33,97
33,96
+33,95
33,95 ($\bar{x}$)

$s = \pm 0{,}019^{\circ}$

$\Delta x = \pm 0{,}042^{\circ}$ (P=95%)

$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}012^{\circ}$ (P=95%)

33,95
-22,39
11,56° (α)

Blindwerte

22,34
22,32
22,40
22,39
22,35
22,32
22,33
22,41
22,37
22,42
22,40
22,41
22,41
22,38
22,39
22,48
22,40
22,40
22,44
22,35
22,39
22,41
22,40
+22,37
22,39 ($\bar{x}$)

$s = \pm 0{,}038^{\circ}$

$\Delta x = \pm 0{,}079^{\circ}$ (P=95 %)

$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}016^{\circ}$ (P=95 %)

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{11{,}56 \cdot 1000}{2{,}00 \cdot 20}$$

$$[\alpha]_D^{20} = +289^{\circ} \pm 0{,}75^{\circ}$$

==========

6.6. Hydrochininbase:

E = 0,37500 g/25,00 ml (c=1,5); l = 20 cm; absoluter Alkohol

Hauptwerte

319,67	$s = \pm 0{,}020^{\circ}$	
319,64		
319,66	$\Delta x = \pm 0{,}043^{\circ}$	(P=95%)
319,59		
319,64	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}011^{\circ}$	(P=95%)
319,65		
319,62		
319,65		
319,65		
319,65		
319,64		
319,65	323,89	
319,65	-319,64	
319,66		
+319,62	$4{,}25^{\circ}$	(α)
319,64	($\bar{x}$)	

Blindwerte

323,89	$s = \pm 0{,}023^{\circ}$	
323,85		
323,90	$\Delta x = \pm 0{,}049^{\circ}$	(P=95 %)
323,91		
323,89	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}012^{\circ}$	(P=95 %)
323,88		
323,87		
323,93		
323,89		
323,93		
323,90		
323,88		
323,91		
323,87		
323,92		
+323,90		
323,89	($\bar{x}$)	

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{4{,}25 \cdot 1000}{1{,}50 \cdot 20}$$

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = -142^{\circ} \pm 0{,}8^{\circ}$$

6.7. Hydrochininhydrochlorid:

Hergestellt aus Hydrochininbase

E = 0,40912 g Hydrochininbase/25,00 ml; Zusatz von 1,378 + 2,450 ml n-Salzsäure, mit Wasser aufgefüllt (c=2,0); l = 20 cm;

Hauptwerte		Blindwerte	
315,81	$s = \pm 0{,}034^{\circ}$	s. Chininhydrochlorid	
315,83			
315,88	$\Delta x = \pm 0{,}074^{\circ}$ (P=95%)	324,33 ($\bar{x}$)	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}020^{\circ}$
315,78			
315,75	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}020^{\circ}$ (P=95%)		(P=95 %)
315,82			
315,81			
315,84			
315,87			
315,82	324,33		
315,81	-315,81		
315,80			
315,80	$8{,}52^{\circ}$ (α)		
+315,79			
315,81 ($\bar{x}$)			

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{8{,}52 \cdot 1000}{2{,}00 \cdot 20}$$

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = -213^{\circ} \pm 1^{\circ}$$

6.8. Hydrochininsulfat:

Hergestellt aus Hydrochininbase

E = 0,43590 g Hydrochininbase/25,00 ml; Zusatz von 13,303 ml 0,1 n-Schwefelsäure (F=1,0172) + 2,630 ml 1,0 n-Salzsäure (F=1,0735), mit Wasser aufgefüllt (c=2,0); l = 20 cm;

Hauptwerte		Blindwerte
315,73	$s = \pm 0{,}034^{\circ}$	s. Chininbase
315,68		
315,77	$\Delta x = \pm 0{,}076^{\circ}$ (P=95%)	323,93 ($\bar{x}$) $\Delta \bar{x} = \pm 0{,}014^{\circ}$ (P=95%)
315,71		
315,74	$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}022^{\circ}$ (P=95%)	
315,70		
315,67		
315,71		
315,71	323,93	
315,77	-315,71	
315,67		
+315,69	$8{,}22^{\circ}$ (α)	
315,71 ($\bar{x}$)		

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{8{,}22 \cdot 1000}{2{,}00 \cdot 20}$$

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = -205{,}5^{\circ} \pm 0{,}9^{\circ}$$

6.9. Hydrochinidinbase:

E = 0,7503 g/50,00 ml (c=1,5); l = 20 cm; absoluter Alkohol

Hauptwerte

29,40
29,32
29,30
29,28
29,31
29,33
29,27
29,24
29,28
29,28
29,30
+29,30
29,30 ($\bar{x}$)

$s = \pm 0{,}039^{\circ}$

$\Delta x = \pm 0{,}087^{\circ}$ (P=95%)

$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}025^{\circ}$ (P=95%)

29,30
-22,35
6,95° (α)

Blindwerte

22,42
22,37
22,36
22,39
22,30
22,40
22,31
22,33
22,40
22,34
22,33
22,40
22,31
+22,31
22,35 ($\bar{x}$)

$s = \pm 0{,}042^{\circ}$

$\Delta x = \pm 0{,}090^{\circ}$ (P=95%)

$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}024^{\circ}$ (P=95%)

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{6{,}95 \cdot 1000}{1{,}50 \cdot 20}$$

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = +232^{\circ} \pm 1{,}6^{\circ}$$

6.10. Hydrochinidinsulfat:

Hergestellt aus Hydrochinidinbase

E = 0,43590 g Hydrochinidinbase/25,00 ml; Zusatz von 13,303 ml 0,1 n-Schwefelsäure (F=1,0172) + 2,630 ml 1,0 n-Salzsäure (F=1,0735), mit Wasser aufgefüllt (c=2,0); l = 20 cm;

Hauptwerte

32,78
32,76
32,74
32,69
32,69
32,72
32,70
32,67
32,70
32,74
32,68
32,75
32,77
32,71
32,67
+32,72

32,72 ($\bar{x}$)

$s = \pm 0{,}034^{\circ}$

$\Delta x = \pm 0{,}072^{\circ}$ (P=95%)

$\Delta \bar{x} = \pm 0{,}018^{\circ}$ (P=95%)

32,72
-22,39

$10{,}33^{\circ}$ (α)

Blindwerte

s. Chinidinsulfat

22,39 ($\bar{x}$) $\Delta \bar{x} = \pm 0{,}016^{\circ}$ (P=95%)

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

$$= \frac{10{,}33 \cdot 1000}{2{,}00 \cdot 20}$$

$$[\alpha]_D^{20} = +258^{\circ} \pm 0{,}85^{\circ}$$

ab. 6: Hydrochiningehalt, Schmelzpunkte und Optische Drehung verschiedener Chininpräparate des Handels.

r.	Substanz	Gehalt Hydrochinin	Schmelzpunkte Kapillarmethode	Metallblock DAB7	Leitz-Mikroskop	Spezifisch Drehung
1	Chininum pur. anhydr."Buchler"	6,35 %	177°	176,8 - 177,2° = 177,8° k	177,5 - 179,0°	$[\alpha]_D^{20}$=-163,0 c=1,5;abs.
2	Chininum pur.anhydr."Boehring."	7,30 %	176,5 - 177,0°	175,6 - 176,2° = 176,6° k	177,0 - 178,5°	$[\alpha]_D^{20}$=-163,7 c=1,5;abs.A
3	Chininbase umkrist.aus Nr.2	4,75 %	177 - 178°	176,6 - 177,4° = 177,8° k	177,0 - 178,5°	$[\alpha]_D^{20}$=-162,7 c=1,5;abs.A
4	Chininbase unbekannter Herkunft	2,00 %	177,5 - 178,5°	177,4 - 178,2° = 178,6° k	178,5 - 179,5°	$[\alpha]_D^{20}$=-167,0 c=1,5;abs.A
5	Chininbase DAB6 aus Sulfat herg.	3,40 %				
6	Chininum sulfur. "Boehringer"	6,55 %				
7	Chininsulfat DAB 6	7,90 %				
8	Chinin.hydrochl. puriss "Boehringer"	9,55 %				
9	Chinin.sulfur. puriss. "Boehringer"	7,30 %				

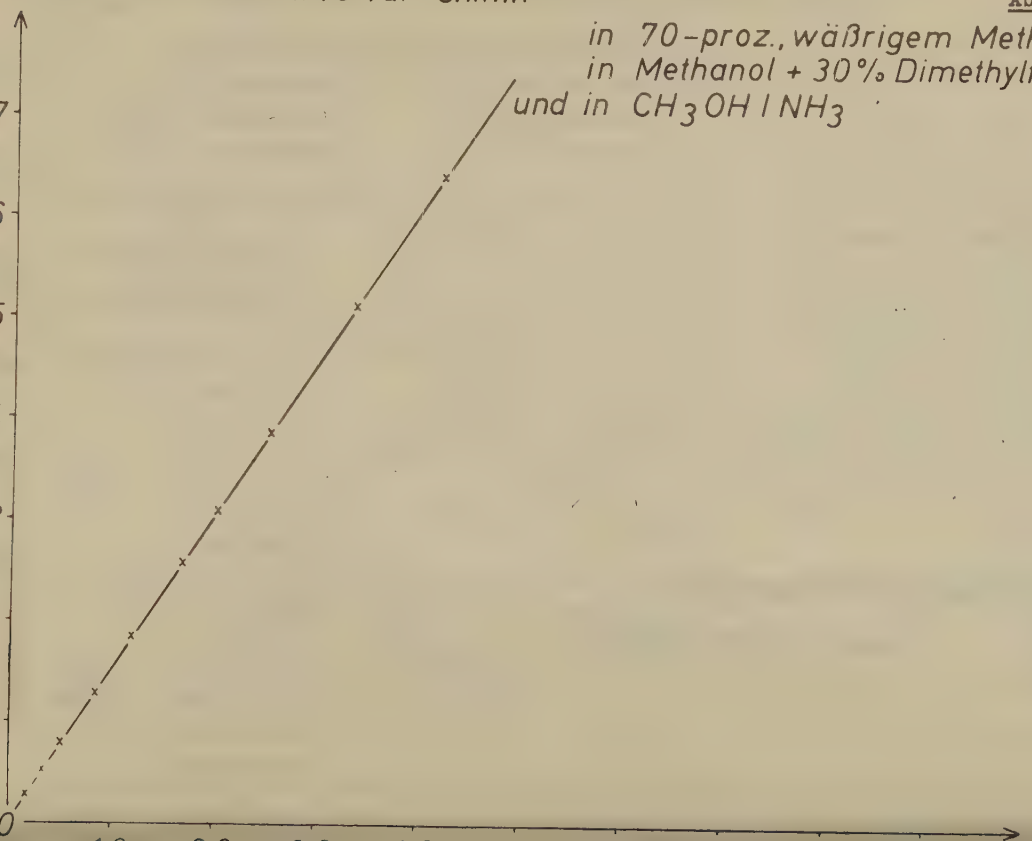
Tab. 7 : Hydrochinidingehalt, Schmelzpunkte und Optische Drehung verschiedener Chinidinpräparate des Handels.

Nr.	Substanz	Hydrochinidin-Gehalt	Schmelzpunkte: Kapillarmethode	Schmelzpunkte: Metallblock DAB7	Schmelzpunkte: App.n.Opfer/Schaum	Spezifische Drehung
1	Chinidinum purum "Merck"	9,30 %	172°	171,5° = 172,1° k	167,5 - 168,0° = 169,0° k	$[\alpha]_D^{20}$=+263,6 c=1,5;abs.A
2	Chinidinum purum "Boehringer" 49	10,15 %	172°	173,0° = 173,6° k	169,0° = 170,0° k	$[\alpha]_D^{20}$=+258,6 c=1,5;abs.A
3	Chinidinum purum "Boehringer" 62	14,20 %	172,6°	172,0° = 172,6° k	168,1° = 169,0° k	$[\alpha]_D^{20}$=+254,1 c=1,5;abs.A
4	Chinidinum purum "Roth"	12,30%	171,4°	172,0° = 172,6° k	168,0° = 169,0° k	$[\alpha]_D^{20}$=+253,4 c=1,5;abs.A
5	Chinidinum sulf. "Merck"	12,50 %				
6	Chinidinum sulf. "Boehringer"	11,70 %				

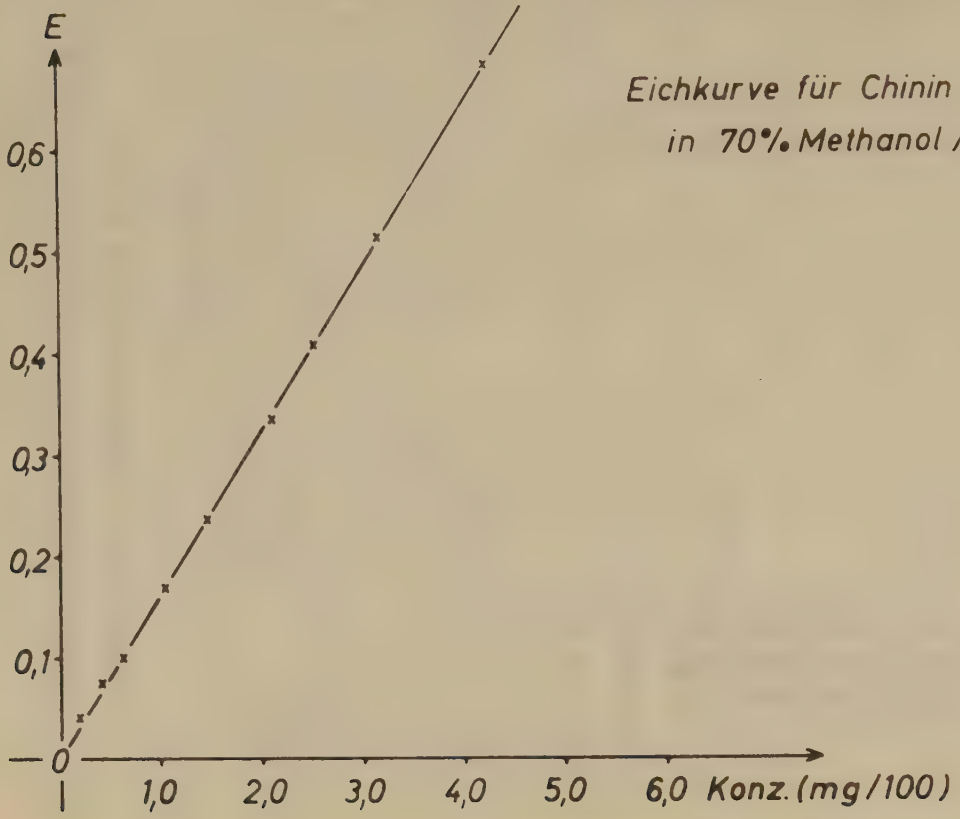
Abb. 38

Eichkurve für Chinin

in 70-proz., wäßrigem Methanol
in Methanol + 30% Dimethylformamid
und in CH_3OH / NH_3



λ = 332 nm
c = mg / 100 ml
d = 1,000 cm
Spalt ≈ 0,25
Verst. = 10 / 1 / I
$\Delta\lambda \approx$ 2,2 nm



Eichkurve für Chinin Abb. 39

in 70% Methanol / verd. H_2SO_4 (10%)

λ = 348 nm
c = mg/100 ml
d = 1,000 cm
Spalt ≈ 0,13
Verst. = 10 / 1 / I
$\Delta\lambda \approx 1{,}3$ nm

Tab. 8: Elution von Chinin. Über Mikrochromatographiesäulen

Chininbase 89,2 mg/10,00 ml Chloroform

Filterhilfsmittel: Zellulosepulver zur DC
Elutionsmittel : 70-proz. Methanol
Elutionsdauer : 6 - 8 Stunden

Auftrage-Volumen und -Konzentration		150 Teilstriche = 27,0 µl = 241 γ Chinin	150 Teilstriche = 27,0 µl = 241 γ Chinin	150 Teilstriche = 27,0 µl = 241 γ Chinin	200 Teilstriche = 36,0 µl = 321 γ Chinin
1. Serie	wiedergefundene Menge (a)	E = 0,360 = 233 γ Chinin	E = 0,366 = 237 γ Chinin	E = 0,400 = 259 γ Chinin	E = 0,557 = 362 γ Chinin
	wiedergefundene Menge in % Auftragekonz.	96,6 %	98,3 %	107,6 %	112,8 %
2. Serie	wiedergefundene Menge (b)	E = 0,370 = 239 γ Chinin	E = 0,328 = 211 γ Chinin		E = 0,504 = 327 γ Chinin
	wiedergefundene Menge in % Auftragekonz.	99,1 %	87,5 %		101,9 %

Tab. 9: Elution von Chinin über Mikrochromatographiesäulen

Chininbase 89,0 mg / 10,00 ml Chloroform

Filterhilfsmittel : Zellulosepulver zur DC
Elutionsmittel : 70-proz. Methanol
Elutionsdauer : 2,5 - 4 Stunden
Filtration des Eluats (Blauband)

Auftrage-Volumen und -Konzentration	130 Teilstriche = 23,4 µl = 208 γ Chinin	150 Teilstriche = 27,0 µl = 240 γ Chinin	180 Teilstriche = 32,4 µl = 289 γ Chinin	200 Teilstriche = 36,0 µl = 321 γ Chinin
wiedergefundene Menge	E = 0,211 = 135 γ Chinin	E = 0,259 = 166 γ Chinin	E = 0,276 = 178 γ Chinin	E = 0,356 = 230 γ Chinin
wiedergefundene Menge in % der Auftragekonzentration	64,8 %	69,2 %	61,6 %	71,6 %

Tab. 10: Elution von Chinin über Mikrochromatographiesäulen

Chininbase 92,4 mg / 10,00 ml Chloroform

Filterhilfsmittel : Linterspulver 124
Elutionsmittel : 70-proz. Methanol
Elutionsdauer : 2,5 - 4 Stunden

Auftrage - Volumen und - Konzentration		150 Teilstr. = 27,0 µl = 250 γ Chinin	200 Teilstr. = 36,0 µl = 333 γ Chinin	250 Teilstr. = 45,0 µl = 416 γ Chinin	300 Teilstr. = 54,0 µl = 499 γ Chinin
1.	wiedergefundene Menge (a)	E = 0,370 = 239 γ Chinin	E = 0,472 = 308 γ Chinin	E = 0,606 = 395 γ Chinin	E = 0,725 = 473 γ Chinin
Serie	= % der Auftragekonz.	95,6 %	92,5 %	95,0 %	94,7 %
2.	wiedergefundene Menge (b)	E = 0,366 = 237 γ Chinin	E = 0,492 = 320 γ Chinin		
Serie	= % der Auftragekonz.	94,7 %	96,1 %		
3.	wiedergefundene Menge (c)	E = 0,351 = 227 γ Chinin	E = 0,476 = 309 γ Chinin		
Serie	= % der Auftragekonz.	90,8 %	92,8 %		

Tab. 11: Elution von Chinin über Mikrochromatographiesäulen

Chininbase 97,2 mg / 10,00 ml Chloroform

Filterhilfsmittel: Linterspulver 124

Elutionsmittel : Methanol + 10 % verdünnte Schwefelsäure

Elutionsdauer : 2,5 - 4 Stunden

Auftrage - Volumen und - Konzentration		50 Teilstr. = 9,0 µl = 87,5 γ Chinin	80 Teilstr. = 14,4 µl = 140 γ Chinin	100 Teilstr. = 18,0 µl = 175 γ Chinin	120 Teilstr. = 21,6 µl = 210 γ Chinin	150 Teilstr. = 27,0 µl = 262 γ Chinin	200 Teilstr. = 36,0 µl = 350 γ Chinin
1. Serie	wiedergefundene Menge (a)	E = 0,153 = 95 γ Chinin	E = 0,230 = 142 γ Chinin	E = 0,308 = 191 γ Chinin	E = 0,352 = 217 γ Chinin		
	= % der Auftragekonz.	108,6 %	101,5 %	109,2 %	103,5 %		
2. Serie	wiedergefundene Menge (b)			E = 0,315 = 194 γ Chinin	E = 0,349 = 215 γ Chinin	E = 0,452 = 278 γ Chinin	E = 0,608 = 375 γ Chinin
	= % der Auftragekonz.			110,8 %	102,5 %	106,3 %	107,2 %

Tab. 12: Elution von Chinin über Mikrochromatographiesäulen

Chininbase 153,5 mg / 10,00 ml Chloroform

Filterhilfsmittel : Linterspulver 124
Elutionsmittel : Methanol + 30 % Dimethylformamid
Elutionsdauer : 2 - 3 Stunden

Auftrage - Volumen und - Konzentration		50 Teilstr. = 9,0 µl = 138 γChinin	60 Teilstr. = 10,8 µl = 166 γChinin	70 Teilstr. = 12,6 µl = 193 γChinin	80 Teilstr. = 14,4 µl = 221 γChinin
1. Serie	wiedergefundene Menge (a)	E = 0,228 = 153γ Chinin	E = 0,302 = 204γ Chinin	E = 0,346 = 234γ Chinin	E = 0,341 = 231γ Chinin
	= % der Auftragekonz.	111,0 %	123,0 %	121,3 %	104,6 %
2. Serie	wiedergefundene Menge (b)	E = 0,194 = 131γ Chinin	E = 0,259 = 175γ Chinin	E = 0,325 = 220γ Chinin	E = 0,389 = 263γ Chinin
	= % der Auftragekonz.	94,8 %	105,5 %	114,0 %	119,0 %

Tab. 13 : Elution von Chinin über Mikrochromatographiesäulen
Chininbase 108,4 mg / 10,00 ml Chloroform

Filterhilfsmittel : Linterspulver 124
Elutionsmittel : Methanol + 10 % Ammoniak (10-proz.)
Elutionsdauer : 2 - 3 Stunden

Auftrage - Volumen und - Konzentration		50 Teilstr. = 9,0 µl = 98 γ Chinin	80 Teilstr. = 14,4 µl = 156 γ Chinin	100 Teilstr. = 18,0 µl = 195 γ Chinin	120 Teilstr. = 21,6 µl = 234 γ Chinin	150 Teilstr. = 27,0 µl = 293 γ Chinin	180 Teilstr. = 32,4 µl = 351 γ Chinin
1. Serie	wiedergefundene Menge (a)			E = 0,290 = 193 γ Chinin	E = 0,329 = 220 γ Chinin	E = 0,431 = 287 γ Chinin	E = 0,527 = 352 γ Chinin
	= % der Auftragekonz.			98,9 %	94,0 %	97,9 %	100,3 %
2. Serie	wiedergefundene Menge (b)			E = 0,315 = 210 γ Chinin	E = 0,367 = 245 γ Chinin	E = 0,459 = 307 γ Chinin	E = 0,538 = 358 γ Chinin
	= % der Auftragekonz.			107,8 %	104,8 %	104,8 %	102,0 %
3. Serie	wiedergefundene Menge (c)	E = 0,153 = 102 γ Chinin	E = 0,233 = 156 γ Chinin	E = 0,284 = 189 γ Chinin	E = 0,367 = 245 γ Chinin		
	= % der Auftragekonz.	104,1 %	100,0 %	96,8 %	104,8 %		
4. Serie	wiedergefundene Menge (d)	E = 0,156 = 104 γ Chinin	E = 0,230 = 153 γ Chinin	E = 0,292 = 195 γ Chinin	E = 0,360 = 240 γ Chinin		
	= % der Auftragekonz.	106,1 %	98,0 %	100,0 %	102,6 %		

Tab. 14 : Elution von Chinin über Mikrochromatographiesäulen

Chininbase 153,5 mg / 10,00 ml Chloroform

Filterhilfsmittel : Linterspulver 124

Elutionsmittel : Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.)

Elutionsdauer : 2 - 3 Stunden

Auftrage-Volumen und -Konzentration	50 Teilstr. = 9,0 µl = 138 γ Chin.	60 Teilstr. = 10,8 µl = 166 γ Chin.	70 Teilstr. = 12,6 µl = 193 γ Chin.	80 Teilstr. = 14,4 µl = 221 γ Chin.	90 Teilstr. = 16,2 µl = 249 γ Chin.	100 Teilstr. = 18,0 µl = 276 γ Chin.	110 Teilstr. = 19,8 µl = 304 γ Chin.	120 Teilstr. = 21,6 µl = 332 γ Chin.
wiedergefundene Menge	E=0,208= 138 γ Chin.	E=0,253= 168 γ Chin.	E=0,302= 201 γ Chin.	E=0,324= 216 γ Chin.	E=0,372= 248 γ Chin.	E=0,415= 277 γ Chin.	E=0,450= 300 γ Chin.	E=0,502= 335 γ Chin.
= % der Auftragekonzentration	100,0 %	101,2 %	104,2 %	97,7 %	99,6 %	100,4 %	98,7 %	100,6 %

Tab. 15: Quantitative Chininbestimmung aus Alkaloidgemischen
Filterhilfsmittel : Linterspulver zur DC
Elutionsmittel : Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.)
Elution über Mikrochromatographiesäulen

Chinin	aufgetragene Menge	132 γ	132 γ	212 γ	212 γ	161 γ	161 γ	66 γ	106 γ	81 γ
	wiedergefundene Menge	136 γ	138 γ	203 γ	206 γ	153 γ	173 γ	62 γ	105 γ	87 γ
	= % der Auftragekonz.	103,2%	104,7%	95,7%	97,2%	95,0%	107,5%	94,0%	99,0%	107,5 %
Chinidin		78 γ	78 γ	158 γ	158 γ	268 γ	268 γ	42 γ	79 γ	135 γ
Cinchonin		25 γ	25 γ	4 γ	4 γ	-	-	13 γ	2 γ	-
Cinchonidin		8 γ	8 γ	20 γ	20 γ	-	-	4 γ	10 γ	-
Hydrochinin		12 γ	12 γ	6,5 γ	6,5 γ	-	-	6 γ	3 γ	-
Hydrochinidin		20 γ	20 γ	8 γ	8 γ	-	-	10 γ	4 γ	-

Tab. 16: Fluoreszenzspektrum von C h i n i n in Methanol/Schwefelsäure

gemessen in Methanol + 3 % verd. Schwefelsäure DAB 6 (0,1 n)

Einwaage: 98 Chininbase (Buchler) in 100 ml Methanol/Schwefelsäur

(9,8 mg / 100 ml 1,0 ml = 98 / 100 ml)

d = 1,000 cm; c = $3 \cdot 10^{-6}$ molar; Verst.= 10/10/I; Spalt 0,5;

Anregungs - = 365 nm (Filter E);

Einstellung des Durchlaßgrades T bei 460 nm (Fluoreszenzmax.) auf 100 %;

λ (nm)	T	λ (nm)	T	λ (nm)	T
380	1,5 %	424	59,5 %	456	99,0 %
385	3,0 %	426	63,5 %	458	99,5 %
390	5,0 %	428	67,5 %	460	100,0 %
395	9,0 %	430	71,5 %	470	96,0 %
400	14,5 %	432	75,0 %	475	92,0 %
402	17,3 %	434	78,5 %	480	87,0 %
404	20,3 %	436	82,0 %	490	76,0 %
406	23,5 %	438	85,0 %	500	64,5 %
408	27,0 %	440	88,0 %	510	57,5 %
410	30,5 %	442	90,5 %	520	41,0 %
412	34,5 %	444	92,5 %	530	31,5 %
414	38,5 %	446	94,5 %	540	23,5 %
416	42,5 %	448	96,0 %	550	17,0 %
418	46,5 %	450	97,0 %	560	12,0 %
420	51,0 %	452	98,0 %	570	8,0 %
422	55,0 %	454	98,7 %	580	6,0 %

Tab. 17 : Fluoreszenzmessungen von Chinin in Alkaloidgemischen nach dünnschichtchromatographischer Trennung.
Filterhilfsmittel : Linterspulver 124
Elutionsmittel : Methanol + 10 % Ammoniak (25-proz.)

Chinin	Aufgetragene Menge	29,3 γ	14,6 γ	32,1 γ	16,1 γ
	wiedergefundene Menge in % T	T = 90,6 % = 31,7 γ	T = 91,1 % = 15,9 γ	T = 89,0 % = 31,1 γ	T = 94,2 % = 16,5 γ
	= % Auftragekonz.	108,3 %	108,8 %	97,0 %	102,6 %
T - Stand.=100 %		35 γ	17,5 γ	35 γ	17,5 γ
Chinidin		49 γ	24 γ	73 γ	37 γ
Cinchonin		5 γ	2 γ	4 γ	2 γ
Cinchonidin		11 γ	5 γ	10 γ	5 γ
Hydrochinin		7 γ	3 γ	9 γ	5 γ
Hydrochinidin		4 γ	2 γ	19 γ	9 γ

7. Prüfung von Chinidinsulfat mit Silbernitrat.

0,50090 g Chinidinbase, präparativ schichtchromatographisch gereinigt, werden mit verdünnter Schwefelsäure (16 %) und nachfolgendes Neutralisieren mit verdünntem Ammoniak (10 %) zum neu-

tralen Sulfat gelöst und aus einem Volumen von ca. 50 ml mit 5 ml 5-proz. Silbernitratlösung gefällt. Der Niederschlag wird 5-mal mit destilliertem Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

7.1. Nitratbestimmung:

Die Nitratbestimmung erfolgte photometrisch durch Messung der Farbintensität mit Diphenylamin-Schwefelsäure bei 600 nm. Bereitung des Reagens (nach H.A.Suter und P.A.Suter in Mikrochim. Acta 1956, 1136):

250 mg Ammoniumchlorid werden in 90 ml Wasser gelöst. Hinzugefügt wird eine Lösung von 250 mg Diphenylamin in ca. 100 ml konzentrierter Schwefelsäure. Nach Abkühlen wird mit konzentrierter Schwefelsäure auf 250 ml aufgefüllt.

Mittels einer Silbernitrat - Stammlösung von 107,0 γ / 100,00 ml wurde eine Eichkurve bei 600 nm aufgestellt.

$AgNO_3$ in /100 ml	E
31,2	1,175
23,4	0,600
18,7	0,440
15,6	0,413
7,8	0,140
3,1	0,063

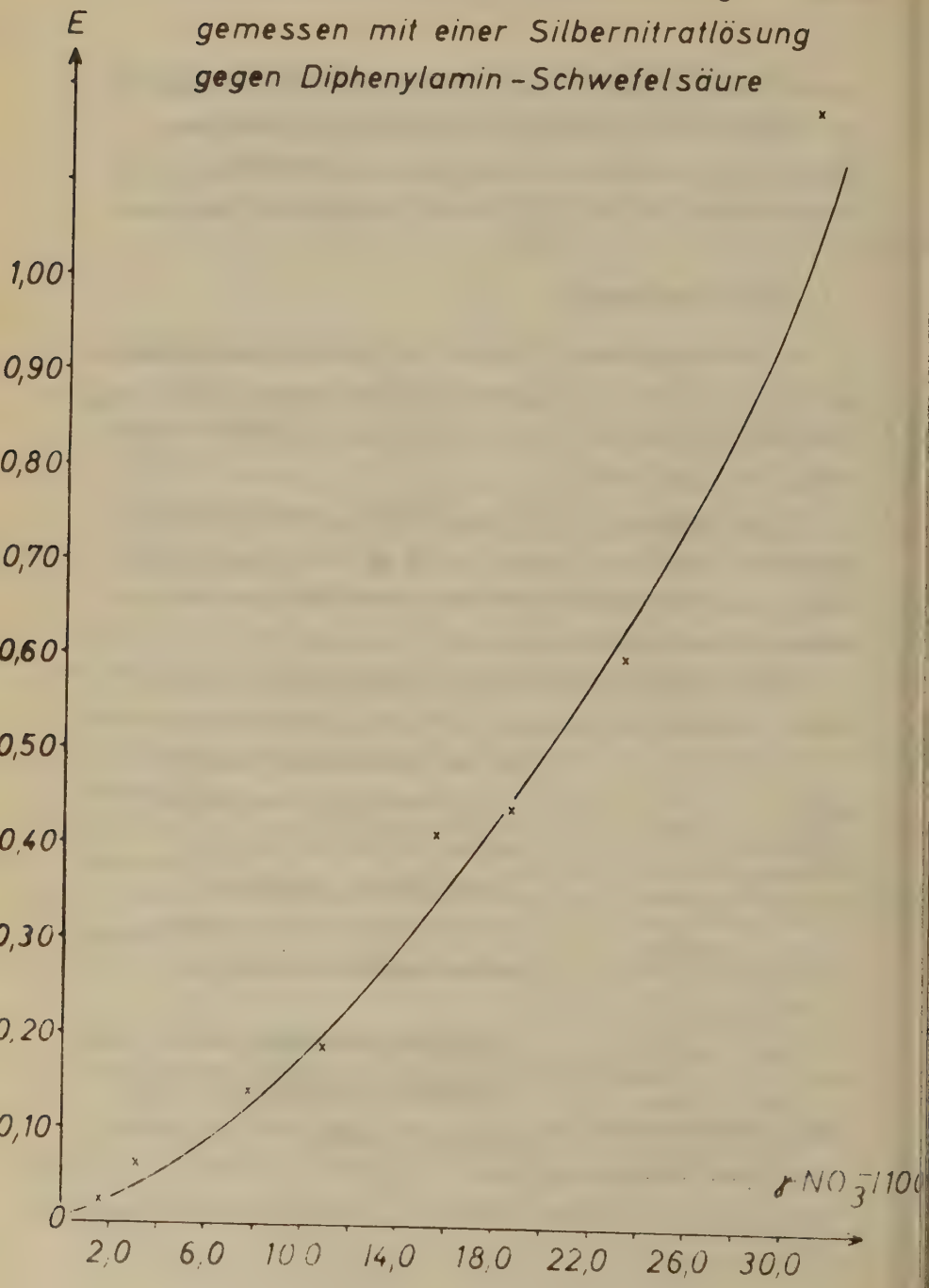
Zu den Eichlösungen wurden je 5 ml Diphenylamin-Reagenz zugefügt und mit ca. 64-proz. Schwefelsäure aufgefüllt. Gemessen wurde gegen Diphenylamin-Reagenz als Blindwert.

Niederschlagseinwaage 460 γ / 100,00

Gemessene Extinktion E = 0,715

= 25,6 γ / 100 ml

Eichkurve für Nitrat-Bestimmung Abb. 40
gemessen mit einer Silbernitratlösung
gegen Diphenylamin-Schwefelsäure



7.2. Silberbestimmung:

Die Silberbestimmung wurde volumetrisch nach Volhard mit 0,1 n - Ammoniumrhodanid-lösung durchgeführt.

a) Einwaage: 0,09145 g Niederschlag
Verbrauch: 0,973 ml 0,1 n - Ammoniumrhodanid = 10,497 mg Ag
Gehalt an Ag : 11,48 %

b) Einwaage: 0,06180 g Niederschlag
Verbrauch: 0,640 ml 0,1 n - Ammoniumrhodanid = 6,904 mg Ag
Gehalt an Ag: 11,17 %

Mittelwert aus beiden Bestimmungen: 11,32 % Ag

7,3. Sulfatbestimmung:

Die Sulfatbestimmung wurde ebenfalls maßanalytisch mit 0,02 n - Bariumperchloratlösung und Thorin als Indikator durchgeführt.

Einwaage: 0,01093 g Niederschlag
Verbrauch: 1,050 ml 0,02 n - Bariumperchlorat = 1,0087 mg SO_4''
Gehalt: 9,23 % Sulfat

7.4. Elementaranalyse des Niederschlags.

Analyse: $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot AgNO_3 \cdot 2\,H_2O$ (952,84)

Ber.:	C 50,42 %	H 5,50 %	N 7,35 %	S 3,36 %
Gef.:	C 50,34 %	H 5,60 %	N 7,28 %	S 3,43 %
	C 50,64 %	H 5,66 %	N	S 3,56 %

8. Statistische Prüfverfahren.

8.1. Die F - Prüfung:

Die Reproduzierbarkeit zweier Verfahren läßt sich mit der F - Prüfung vergleichen. Es wird der Quotient der Varianzen gebildet:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

F wird mit einem Tabellenwert verglichen, der von der geforderten statistischen Sicherheit P und der mit s_1 und s_2 verknüpften Anzahl der Freiheitsgrade n_1 und n_2 abhängt. F muß hierbei stets größer sein als 1, d.h. die größere Standardabweichung steht im Zähler des Bruches. Ein gesicherter Unterschied zwischen s_1 und s_2 liegt dann vor, wenn $F \geq F(P,n_1,n_2)$.

8.2. Die χ^2 - Prüfung:

Analog zur F - Prüfung ist mit der χ^2 - Prüfung eine Aussage möglich über die Reproduzierbarkeit von mehr als 2 Verfahren. Man berechnet

$$\chi^2 = 2{,}303\ (n_g \cdot \lg s^2 - \Sigma n_j \cdot \lg s_j^2)$$

Hierbei bedeuten:

n_g = Zahl aller Freiheitsgrade; bei M Meßserien beträgt die Zahl der Freiheitsgrade N - M (N=Gesamtanzahl aller Messungen)

s = Standardabweichung aus allen Meßserien; sie ergibt sich aus der Beziehung

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_{i1} - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_{i2} - \bar{x}_2)^2 + \cdots \sum (x_{iM} - \bar{x}_M)^2}{N - M}} =$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum\sum (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{N - M}}$$

x_{ij} = Meßwert in der j-ten Gruppe

$\bar{x}_j$ = Mittelwert der j-ten Gruppe

N = Zahl aller Messungen

M = Zahl der Proben

n_j = Zahl der Freiheitsgrade in der j-ten Gruppe

s_j = Standardabweichung in der j-ten Gruppe

8.3. Die Korrelationsrechnung:

Der Korrelationskoeffizient r ist ein Maß für die "stochastische" Abhängigkeit zweier Variablen x und y voneinander. Der Wert von r kann zwischen -1 und +1 schwanken. Bei r = + 1 besteht ein sicherer funktioneller Zusammenhang, x und y wachsen gleichsinnig. r = - 1 bedeutet gleichfalls funktionelle Abhängigkeit der Veränderlichen, x und y wachsen hier aber gegensinnig. Bei r = 0 besteht keinerlei Abhängigkeit zwischen x und y. Je geringer die Abweichung von + 1 oder - 1 ist, desto sicherer ist der funktionelle Zusammenhang der Variablen.

In dem vorliegenden Fall der Eichkurve von Chininbase in Methanol/Ammoniak gibt die Korrelationsrechnung Auskunft darüber, ob zwischen der Chininkonzentration x (γ / ml) und der gemessenen Extinktion y ein linearer Zusammenhang besteht,

d. h. ob das Lambert-Beer'sche Gesetz im untersuchten Konzentrationsbereich erfüllt ist. Die Berechnung erfolgt nach

$$r = \frac{N \cdot \Sigma x_i \cdot y_i - \Sigma x_i \cdot \Sigma y_i}{\sqrt{\left[N \cdot \Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2\right] \cdot \left[N \cdot \Sigma y_i^2 - (\Sigma y_i)^2\right]}}$$

Es bedeuten

x_i = gemessene Konzentration in γ/ml (Eichkurve)

y_i = gemessene Extinktion pro Eichpunkt (Mittelwerte aus 8 Messungen)

N = Anzahl der Meßserien (Eichpunkte)

r muß stets auf seine Abweichung von 0 geprüft werden nach:

$$t = \frac{|r|}{\sqrt{1 - r^2}} \cdot \sqrt{N - 2}$$

t wird anschließend mit einem Tabellenwert t(P,n) verglichen, die Zahl der Freiheitsgrade beträgt hier $n = N - 2$.
Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen x und y besteht nur dann, wenn $t > t(P,n)$.

8.4. Die Regressionsrechnung:

Mit der Regressions- oder Ausgleichsrechnung läßt sich die "bestmögliche" Funktion für zwei Veränderliche x und y finden, deren funktioneller Zusammenhang gemäß $y = f(x)$ zunächst nicht näher bekannt ist. Voraussetzung ist, daß die unabhängige Variable x nahezu als fehlerfrei angesehen werden darf (Regression 1. Art). Ergibt die graphische Darstellung einen linearen Zu-

sammenhang $y = bx + a$, so lassen sich die Koeffizienten b und a aus den Meßwerten nach dem Prinzip der "maximalen Glaubwürdigkeit" berechnen. Zufällige Fehler, die bei der Messung der abhängigen Veränderlichen y entstanden sind, werden nach diesem Prinzip dadurch ausgeglichen, daß die Summe der Quadrate der Abweichungen der gemessenen y_i von den nachträglich aus der Gleichung berechenbaren Y_i auf ein Minimum reduziert wird; die Übereinstimmung zwischen gemessenen y_i und aus der Gleichung berechenbaren Y_i-werte ist dann am besten.

Bei der Aufstellung der Eichkurve des Chinins ist die Alkaloidkonzentration (γ /ml) die unabhängige Veränderliche x, die gemessene Extinktion die abhängige Veränderliche y. Zwischen beiden Variablen besteht ein linearer Zusammenhang $y = bx + a$, wenn das Lambert-Beer'sche Gesetz gültig ist, was sich seinerseits wieder mit der Korrelationsrechnung nachprüfen läßt. Bei N zusammengehörigen Wertepaaren ergibt sich

$$\begin{aligned} y_1 &= bx_1 + a \\ y_2 &= bx_2 + a \\ &\vdots \qquad\quad \vdots \\ y_N &= bx_N + a \end{aligned}$$

Auf der linken Seite stehen die gemessenen (y_i), auf der rechten Seite die berechenbaren Werte $(Y_i = bx_i + a)$. Die bestmögliche Übereinstimmung ergibt sich dann, wenn die Summe der Quadrate der Differenzen zwischen beiden Werten auf ein Minimum reduziert wird, d. h.

$$\Sigma(y_i - Y_i)^2 = \Sigma(y_i - bx_i - a)^2 = \text{Minimum}$$

Für a und b ergibt sich hieraus

$$b = \frac{\sum x_i y_i - N \cdot \bar{x} \cdot \bar{y}}{\sum x_i^2 - N \cdot \bar{x}^2} \quad ; \quad a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Auskunft über die Zuverlässigkeit der errechneten Zahlenwerte und die zulässige Stellenzahl von a und b gibt die Standardabweichung und der sich daraus ergebende Streubereich. Hierfür muß zuerst die Standardabweichung zwischen den gemessenen y_i und den berechneten Y_i bekannt sein.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - N \cdot \bar{y}^2 - b^2 (\sum x_i^2 - N \cdot \bar{x}^2)}{N - 2}}$$

Die Standardabweichung für a und b beträgt dann

$$s_b = \frac{s}{\sqrt{\sum x_i^2 - N \bar{x}^2}} \quad ; \quad s_a = s_b \cdot \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N}}$$

Der Streubereich ergibt sich, wie üblich, zu

$$\Delta x_b = t\,(P,n) \cdot s_b$$
$$\Delta x_a = t\,(P,n) \cdot s_a$$

8.5. Reproduzierbarkeitsbewertung eines Verfahrens:

Aus der durch Regressionsrechnung ermittelten Eichfunktion läßt sich die Reproduzierbarkeit eines Verfahrens abschätzen

durch folgende Beziehung:

$$\Delta \bar{x}_A = \frac{t(P,n)\cdot s}{b}\sqrt{\frac{1}{N_j} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_A - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \left[\Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2/N\right]}}$$

Es bedeuten

$\Delta \bar{x}_A$ = mittlerer Verfahrensfehler
b = Anstieg der Eichgeraden
N_j = Anzahl der Meßwerte
N = Anzahl der Eichproben
s = Standardabweichung zwischen gemessenen und berechneten Eichwerten
$\bar{y}_A$ = Mittelwert der Meßwerte
$\bar{y}$ = Mittelwert der Eichmessungen

8.6. Berechnung des kleinsten, gesichert nachweisbaren Meßwerts:

Der kleinste, gesichert nachweisbare Meßwert kann anhand der experimentell ermittelten Blindwerte nach folgender Beziehung errechnet werden:

$$\bar{x}_u = \bar{x}_B + \frac{t(P,n)\cdot s_B}{\sqrt{N_j}}$$

Es bedeuten

$\bar{x}_u$ = Kleinster nachweisbarer Mittelwert aus N_j Messungen
s_B = Standardabweichung der Blindwerte mit n Freiheitsgraden
$\bar{x}_B$ = Mittlerer Blindwert

Bei Extinktionsmessungen muß $\bar{x}_u$ in den Konzentrationsmaßstab umgerechnet werden; dies geschieht durch Aufstellen der Eichfunktion nach $E - \bar{x}_B = f(c)$

Für c und E wählt man einen gut meßbaren Konzentrationsbereich.

$$f = \frac{E - \bar{x}_B}{c} \quad ; \qquad \bar{c} = \frac{\bar{x}_u}{f} - \frac{\bar{x}_B}{f}$$

9. Eichkurve für die photometrische Bestimmung des Chinins ohne Dünnschichtchromatographie.

9.1. Regressionsrechnung zur Ermittlung der Eichfunktion.

x_i γ / ml	$y_i = E$ (Mittelw.)	$x_i \cdot y_i$	x_i^2	y_i^2
7,202	0,112	0,806624	51,868804	0,012544
11,523	0,190	2,189370	132,779529	0,036100
14,404	0,228	3,284112	207,475216	0,051984
17,285	0,287	4,960795	298,771225	0,082369
21,606	0,353	7,626918	466,819236	0,124609
28,809	0,475	13,684275	829,958481	0,225625
36,011	0,586	21,102446	1296,792121	0,343396
43,213	0,705	30,465165	1867,363369	0,497025
= 180,053	=2,936	=84,119705	=5151,827981	=1,373652

$\sum x_i$ = 180,053 $\quad$ $\bar{x}$ = 22,506625

$\sum y_i$ = 2,936 $\quad$ $\bar{y}$ = 0,3670

$\sum x_i \cdot y_i$ = 84,119705 $\quad$ $\bar{x} \cdot \bar{y}$ = 8,259931375

$\sum x_i^2$ = 5151,827981 $\quad$ $\bar{x}^2$ = 506,5481688906

$\sum y_i^2$ = 1,373652 $\quad$ $\bar{y}^2$ = 0,134689

$N \cdot \bar{x}^2$ = 4052,385351125

$N \cdot \bar{y}^2 = 1{,}077512 \qquad N \cdot \bar{x} \cdot \bar{y} = 66{,}079451$

$$b = \frac{\sum x_i \cdot y_i - N \cdot \bar{x} \cdot \bar{y}}{\sum x_i^2 - N \cdot \bar{x}^2} = \frac{84{,}119705 - 66{,}079451}{5151{,}827981 - 4052{,}385351125}$$

$$b = \frac{18{,}040254}{1099{,}44262987} = 0{,}016408545$$

$b^2 = 0{,}000269240349$

$a = \bar{y} - b\,\bar{x} = \underline{-\,0{,}00230}$

Der Fehler von a und b ergibt sich aus der Standardabweichung zwischen den gemessenen (y_i) und den berechneten (Y_i) Werten:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - N\,\bar{y}^2 - b^2 \left(\sum x_i^2 - N\,\bar{x}^2\right)}{N - 2}}$$

$$= \sqrt{\frac{1{,}373652 - 1{,}077512 - 0{,}000269240349\ (5151{,}827981 - 4052{,}38535}{6}}$$

$$= \sqrt{\frac{0{,}000126}{6}} = \sqrt{0{,}000021}$$

$\underline{s = \pm\ 0{,}0045826}$

Standardabweichung für a und b:

$$s_b = \frac{s}{\sqrt{\sum x_i^2 - N \cdot \bar{x}^2}} = \frac{0{,}0045826}{\sqrt{1099{,}44262987}} = \frac{0{,}0045826}{33{,}1578442}$$

$$s_b = \pm\ 0{,}0001382056 \ ; \quad n = 6$$

$$s_a = s_b \cdot \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N}} = 0{,}0001382056 \cdot \sqrt{\frac{5151{,}827981}{8}} =$$

$$= 0{,}0001382056 \cdot 25{,}3767$$

$$s_a = 0{,}003507206 \ ; \quad n = 6$$

$$\Delta x = t\,(P,n) \cdot s_b = \pm\ 0{,}0003386$$

$$\Delta x = t\,(P,n) \cdot s_a = \pm\ 0{,}0085926$$

$b = 0{,}01641 \pm 0{,}00034$; $a = -0{,}00230 \pm 0{,}0086$

Eichfunktion: $y = 0{,}01641\ X - 0{,}00230$

9.2. Lineare Korrelationsrechnung zur Prüfung auf gegenseitige Abhängigkeit von x_i und y_i.

$$N \cdot \sum x_i \cdot y_i = 84{,}119705 \cdot 8 = 672{,}957640$$

$$\sum x_i \cdot \sum y_i = 180{,}053 \cdot 2{,}936 = 528{,}635608$$

$N \cdot \sum x_i^2 = 5151{,}827981 \cdot 8 = 41214{,}623848$

$(\sum x_i)^2 = (180{,}053)^2 = 32419{,}082809$

$N \cdot \sum y_i^2 = 1{,}373652 \cdot 8 = 10{,}989216$

$(\sum y_i)^2 = (2{,}936)^2 = 8{,}620096$

$$r = \frac{N \cdot \sum x_i \cdot y_i - \sum x_i \cdot \sum y_i}{\sqrt{\left[N \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2\right] \cdot \left[N \cdot \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2\right]}}$$

$$r = \frac{144{,}322032}{\sqrt{(8795{,}541039) \cdot (2{,}369120)}} = \frac{144{,}322032}{144{,}35267}$$

$r = 0{,}9997877$

Prüfung auf Abweichung von 0 :

$$t = \frac{|r|}{\sqrt{1 - r^2}} \cdot \sqrt{N - 2} \; ; \qquad n = N - 2$$

$$= \frac{0{,}9997877}{\sqrt{1 - 0{,}999575445}} \cdot \sqrt{6} = \frac{2{,}448969773}{0{,}020604746} = 118{,}85464$$

$t\,(99\,\%,\ n = 6) = 3{,}707$

$t\,(95\,\%,\ n = 6) = 2{,}447$

$t \gg t\,(P,n)$, d.h. der Zusammenhang zwischen x_i und y_i ist sehr stark gesichert (linearer Zusammenhang).

9.3. χ^2 - Test zur Prüfung auf Vergleichbarkeit der Eichmessungen.

Nr.	s_j	$s_j^2 (s_j \cdot 1000)$	n_j	$n_j \cdot s_j^2 = \sum(x_j - \bar{x}_j)^2$	$\lg s_j^2$	$n_j \cdot \lg s_j^2$
1	0,00306	9,3333	6	55,9998	0.97003	5.82018
2	0,00493	24,2857	7	169,9999	1.38536	9.69752
3	0,00251	6,2857	7	43,9999	0.79835	5.58845
4	0,00342	11,7143	7	82,0001	1.06871	7.48097
5	0,00511	26,1428	7	182,9996	1.41736	9.92152
6	0,00295	8,7143	7	61,0001	0.94023	6.58161
7	0,00723	52,2857	7	365,9999	1.71839	12.02873
8	0,00500	25,0000	7	175,0000	1.39794	9.78558
			55	1136,9993		66.90456
			(ng)	$= n_g \cdot s^2$		$= \sum n_j \cdot \lg s_j^2$

$n_g \cdot s^2 = 1136,9993$

$s^2 = \frac{1136,9993}{55} = 20,67271$

$\lg s^2 = 1.31540$

$n_g \cdot \lg s^2 = 72.34700$

72.34700
-66.90456
5.44244 · 2,303 = 12,5339

$\chi^2 = 12,534$; Tabellenwert für χ^2 (P=95 %, n=7) = 14,067
χ^2 (P=99 %, n=7) = 18,475

Die Standardabweichungen und damit die Zufallsfehler in allen Meßserien sind somit vergleichbar.

9.4. Reproduzierbarkeit der Eichmessungen:

Standardabweichung $s = \pm 0{,}00455 = \pm 1{,}24$ % relat.

Streubereich der Meßwerte $\Delta x = \pm 0{,}0105 = \pm 2{,}86$ % relat.

(bei einer mittleren Extinktion von $\bar{E} = 0{,}367$)

Vertrauensbereich der Extinktionsmittelwerte

$$\Delta \bar{x} = \frac{2{,}31 \cdot 0{,}0045}{\sqrt{8}} = \underline{0{,}0037} = \underline{1{,}01 \text{ \% relat.}}$$

10. Eichkurve zur photometrischen Bestimmung des Chinins nach dünnschichtchromatographischer Entwicklung.

10.1. Regressionsrechnung zur Ermittlung der Eichfunktion:

x_i γ/ml	$y_i = E$ (Mittelw.)	$x_i \cdot y_i$	x_i^2	y_i^2
7,204	0,106	0,763624	51,897616	0,011236
11,527	0,171	1,971117	132,871729	0,029241
14,409	0,223	3,213207	207,619281	0,049729
17,290	0,264	4,564560	298,944100	0,069695
21,613	0,326	7,045838	467,121769	0,106276
28,817	0,450	12,967650	830,419489	0,202500
36,022	0,549	19,776078	1297,584484	0,301401
43,226	0,676	29,220776	1868,487076	0,456976
=180,108	=2,765	=79,522850	=5154,945544	=1,227054

$\sum x_i$	=	180,108	$\bar{x} \cdot \bar{y}$	=	7,7806656
$\sum y_i$	=	2,765	$N.\bar{x} \cdot \bar{y}$	=	62,2453248
$\sum x_i \cdot y_i$	=	79,52285	$\bar{x}^2$	=	506,85768225
$\sum x_i^2$	=	5154,945544	$\bar{y}^2$	=	0,11943936
$\sum y_i^2$	=	1,227054	$N \cdot \bar{x}^2$	=	4054,86145800
$\bar{x}$	=	22,5135	$N \cdot \bar{y}^2$	=	0,95551488
$\bar{y}$	=	0,3456			

$$b = \frac{\sum x_i \cdot y_i - N \cdot \bar{x} \cdot \bar{y}}{\sum x_i^2 - N \cdot \bar{x}^2} = \frac{79,52285 - 62,2453248}{5154,945544 - 4054,861458} = \frac{17,277525}{1100,0840}$$

$b = 0,0157056$

$b^2 = 0,000246666$

$a = \bar{y} - b\bar{x} = 0,3456 - 0,35359$

$a = - 0,00799$

Der Fehler von a und b ergibt sich aus der Standardabweichung zwischen den gemessenen (y_i) und den berechneten Werten (Y_i):

$$s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - N \cdot \bar{y}^2 - b^2 \cdot (\sum x_i^2 - N \cdot \bar{x}^2)}{N - 2}} =$$

$$\sqrt{\frac{1,227054 - 0,9555149 - 0,271353}{6}} = \sqrt{0,0000309667}$$

$s = \pm 0,00556477$

Standardabweichung für a und b:

$$s_b = \frac{s}{\sqrt{\sum x_i^2 - N \cdot \bar{x}^2}} = \frac{0{,}00556477}{\sqrt{1100{,}084086}} = \frac{0{,}00556477}{33{,}167515}$$

$$s_b = \pm\ 0{,}000167778 \quad ; \quad n = 6$$

$$s_a = s_b \cdot \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N}} = 0{,}00016778 \cdot \sqrt{\frac{5154{,}945544}{8}} = 0{,}00016778 \cdot 25{,}38441$$

$$s_a = \pm\ 0{,}004258996 \quad ; \quad n = 6$$

$$\Delta x = t\,(P,n) \cdot s_b = \pm\ 0{,}000410553$$

$$\Delta x = t\,(P,n) \cdot s_a = \pm\ 0{,}010421763$$

$b = 0{,}01571 \pm 0{,}00041$; $a = -0{,}00799 \pm 0{,}0104$

Eichfunktion: $y = 0{,}01571 \cdot x - 0{,}00799$

10.2. Lineare Korrelationsrechnung zur Prüfung auf gegenseitige Abhängigkeit von x_i und y_i.

$N \cdot \sum x_i \cdot y_i = 79{,}52285 \cdot 8 = 636{,}18280$

$\sum x_i \cdot \sum y_i = 180{,}108 \cdot 2{,}765 = 497{,}99862$

$N \cdot \Sigma x_i^2 = 5154{,}945544 \cdot 8 = 41239{,}564352$

$(\Sigma x_i)^2 = 32438{,}891664$

$N \cdot \Sigma y_i^2 = 1{,}227054 \cdot 8 = 9{,}816432$

$(\Sigma y_i)^2 = (2{,}765)^2 = 7{,}645225$

$$r = \frac{N \cdot \Sigma x_i \cdot y_i - \Sigma x_i \cdot \Sigma y_i}{\sqrt{\left[N \cdot \Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2\right] \cdot \left[N \cdot \Sigma y_i^2 - (\Sigma y_i)^2\right]}}$$

$$= \frac{138{,}18418}{\sqrt{8800{,}672688 \cdot 2{,}171207}} = \frac{138{,}18418}{138{,}23199}$$

$r = 0{,}9996541$

Prüfung auf Abweichung von 0 :

$$t = \frac{|r|}{\sqrt{1 - r^2}} \cdot \sqrt{N - 2}; \quad n = N - 2$$

$$= \frac{0{,}9996541}{\sqrt{1 - 0{,}99930832}} \cdot \sqrt{6} = \frac{2{,}44864242}{0{,}02630} = \underline{93{,}10427}$$

t (P=95 %; $n = 6$) = 2,447

t (P=99 %; $n = 6$) = 3,707

$t \gg t(P,n)$, d.h. der Zusammenhang zwischen x_i und y_i ist sehr stark gesichert (linearer Zusammenhang).

10.3. χ^2 - Test zur Prüfung auf Vergleichbarkeit der Eichmessungen:

Nr.	s_j	$s_j^2 (s_j \cdot 1000)$	n_j	$n_j \cdot s_j^2 = \sum(x_j - \bar{x}_j)^2$	$\lg s_j^2$	$n_j \cdot \lg s_j^2$
1	0,00357	12,7143	7	89,0001	1.10429	7.73003
2	0,00409	16,7143	7	117,0001	1.22308	8.56156
3	0,00295	8,7143	7	61,0001	0.94023	6.58161
4	0,00334	11,1428	7	77,9996	1.04700	7.32900
5	0,00541	29,2857	7	204,9999	1.46666	10.26662
6	0,00419	17,5714	7	122,9998	1.24481	8.71367
7	0,00453	20,5000	6	123,0000	1.31175	7.87050
8	0,00655	42,8571	7	299,9997	1.63202	11.42414
			55 (n_g)	1095,9993 $= n_g \cdot s^2$		68.47713 $= \sum n_j \cdot \lg s_j^2$

$n_g \cdot s^2 = 1095,9993$

$s^2 = \frac{1095,9993}{55} = 19,92726$

$\lg s^2 = 1.29945$

$n_g \cdot \lg s^2 = 71.46975$

71.46975
- 68.47713
2.99262 · 2,303 = 6,8920

$\chi^2 = 6,892$; Tabellenwert für χ^2 (P=95%,n=7) = 14,067

χ^2 (P=99%,n=7) = 18,475

Die Standardabweichungen und damit die Zufallsfehler in allen Meßserien sind somit vergleichbar.

10.4. Reproduzierbarkeit der Eichmessungen:

Standardabweichung $s = \pm 0{,}00446 = \pm 1{,}29\ \%$ relat.

Streubereich der Meßwerte $\Delta x = \pm 0{,}0103 = \pm 2{,}98\ \%$ relat.

(bei einer mittleren Extinktion von $\bar{E} = 0{,}367$)

Vertrauensbereich der Extinktionsmittelwerte

$$\Delta \bar{x} = \frac{2{,}31 \cdot 0{,}0045}{\sqrt{8}} = \pm 0{,}0036 = \pm 1{,}05\ \%\ \text{relat.}$$

Tab. 18: Vergleich zwischen dünnschichtchromatographisch aufgetragener und wiedergefundener Konzentration

E-mittelwerte nach chromatograph. Elution	aufgetragene Konzentration	wiedergefundene Konzentrat.	= %-gehalt der Auftragekonz.
0,106	7,20 γ / ml	6,40 γ / ml	88,89 %
0,171	11,53 γ / ml	10,33 γ / ml	89,59 %
0,223	14,41 γ / ml	13,50 γ / ml	93,68 %
0,264	17,29 γ / ml	16,00 γ / ml	92,54 %
0,326	21,61 γ / ml	19,75 γ / ml	91,39 %
0,450	28,82 γ / ml	27,30 γ / ml	94,73 %
0,549	36,02 γ / ml	33,25 γ / ml	92,31 %
0,676	43,23 γ / ml	40,95 γ / ml	94,73 %

Mittlere gefundene Konzentration = 92,23 %

s = ± 2,189 % = ± 2,373 % relat.

Δx = ± 5,047 % = ± 5,472 % relat.

$\Delta \bar{x}$ = ± 1,785 % = ± 1,935 % relat.

Folgende Werte wurden bei der Korrelationsrechnung erhalten:

r = 0,9996541

t = 93,104

t (P=95 %, n=6) = 2,447

t (P=99 %, n=6) = 3,707

11. Quantitative Chininbestimmung aus verschiedenen Chinarinden nach der DC - Methode.

11.1. Cortex Chinae DAB 6, ANZAG, 1953:

Einzelwerte

2,04 %
2,13 %
1,97 %
2,08 %
2,07 %
2,03 %
2,06 %
2,11 %
2,21 %

2,08 % ($\bar{x}_1$)
Mittelwert

Standardabweichung s = ± 0,068 % = 3,28 % relat.

Streubereich Δx = ± 7,58 % relat.
(P = 95 %)

Vertrauensbereich des Mittelwertes $\Delta \bar{x}$ = ± 0,056 % = 2,68 % relat.
(P = 95 %)

11.2. Cortex Chinae WOELM, VI/54:

Einzelwerte		Standardabweichung $s = \pm$ 0,072 % = 2,94 % relat.
2,33 %		
2,42 %		Streubereich $\Delta x = \pm$ 7,55 % relat.
2,50 %		(P = 95 %)
2,45 %	2,44 % ($\bar{x}_2$)	
2,51 %		Vertrauensbereich
2,41 %	Mittelwert	des Mittelwertes $\Delta \bar{x} = \pm$ 0,082 % = 3,38 % relat.

11.3. Cortex Chinae WOELM; 7,38 % T.A.; 2,69 % Chininsulphat:

Einzelwerte		Standardabweichung $s = \pm$ 0,068 % = 6,32 % relat.
0,99 %		
1,03 %		Streubereich $\Delta x = \pm$ 14,6 % relat.
1,06 %		(P = 95 %)
1,11 %		
1,16 %	1,08 % ($\bar{x}_3$)	Vertrauensbereich
1,20 %	Mittelwert	des Mittelwertes $\Delta \bar{x} = \pm$ 0,056 % = 5,16 % relat.
1,08 %		(P = 95 %)
1,04 %		
1,02 %		

11.4. Chinarinde, "Boehringer", Muster 1:

Einzelwerte			
2,16 %		Standardabweichung	$s = \pm$ 0,067 % = 3,13 % relat.
2,06 %		Streubereich (P = 95 %)	$\Delta x = \pm$ 7,22 % relat.
2,13 %			
2,14 %	2,14 % ($\bar{x}_4$)		
2,19 %		Vertrauensbereich des Mittelwertes (P = 95 %)	$\Delta \bar{x} = \pm$ 0,055 % = 2,55 % relat.
2,22 %	Mittelwert		
2,10 %			
2,02 %			
2,21 %			

11.5. Chinarinde, "Boehringer", Muster 2:

Einzelwerte			
		Standardabweichung	$s = \pm$ 0,137 % = 1,88 % relat.
7,26 %			
7,50 %	7,30 % ($\bar{x}_5$)	Streubereich (P = 95 %)	$\Delta x = \pm$ 5,23 % relat.
7,29 %			
7,12 %	Mittelwert	Vertrauensbereich des Mittelwertes (P = 95 %)	$\Delta \bar{x} = \pm$ 0,191 % = 2,61 % relat.
7,35 %			

11.6. Chinarinde, "Boehringer", Muster 3:

Einzelwerte			
		Standardabweichung	$s = \pm$ 0,108 % = 1,94 % relat.
5,52 %			
5,61 %		Streubereich (P = 95 %)	$\Delta x = \pm$ 5,39 % relat.
5,66 %	5,55 % ($\bar{x}_6$)		
5,60 %		Vertrauensbereich des Mittelwertes (P = 95 %)	$\Delta \bar{x} = \pm$ 0,150 % = 2,70 % relat.
5,38 %	Mittelwert		

11.7. Cortex Chinae, DAB 6, ANZAG, 1959:

Einzelwerte		
2,06 %		Standardabweichung s = ± 0,112 % =
1,99 %		5,28 % relat.
1,98 %		Streubereich Δx = ± 12,52 % relat.
2,20 %	2,12 % ($\bar{x}_7$)	(P = 95 %)
2,28 %		Vertrauensbereich
2,08 %	Mittelwert	des Mittelwertes $\Delta \bar{x}$ = ± 0,100 % =
2,19 %		(P = 95 %) 4,74 % relat.
2,22 %		

11.8. Cortex Chinae, DAB 6, ANZAG, 1962:

Einzelwerte		
2,39 %		Standardabweichung s = ± 0,109 % =
2,48 %		4,44 % relat.
2,49 %		Streubereich Δx = ± 10,88 % relat.
2,26 %	2,44 % ($\bar{x}_8$)	(P = 95 %)
2,48 %		Vertrauensbereich
2,61 %	Mittelwert	des Mittelwertes $\Delta \bar{x}$ = ± 0,108 % =
2,41 %		(P = 95 %) 4,43 % relat.

11.9. Cortex Chinae, WOELM, San Thomé:

Einzelwerte		
1,53 %		Standardabweichung s = ± 0,092 % =
1,58 %		6,26 % relat.
1,43 %		Streubereich Δx = ± 17,43 % relat.
1,49 %	1,47 % ($\bar{x}_9$)	(P = 95 %)
1,34 %		Vertrauensbereich
	Mittelwert	des Mittelwertes $\Delta \bar{x}$ = ± 0,128 % =
		(P = 95 %) 8,72 % relat.

11.10. χ^2 - Test zur Prüfung auf Vergleichbarkeit der Einzelwerte aller Drogen:

Nr.	s_j	$s_j^2 (s_j \cdot 1000)$	nj	$n_j \cdot s_j^2 = \sum(x_j - \bar{x}_j)^2$	lg s_j^2	$n_j \cdot$ lg s_j^2
1	0,06827	4660,8	8	37286,4	3.66846	29.34768
2	0,07163	5130,8	5	25654,0	3.71018	18.55090
3	0,06811	4639,0	8	37112,0	3.66642	29.33136
4	0,06684	4467,7	8	35741,6	3.65008	29.20064
5	0,13734	18862,3	4	75449,2	4.27560	17.10240
6	0,10768	11595,0	4	46380,0	4.06427	16.25708
7	0,11225	12600,1	7	88200,7	4.10037	28.70259
8	0,10858	11789,6	6	70737,6	4.07150	24.42900
9	0,09227	8513,8	4	34055,2	3.93012	15.72048
			54 (n_g)	450616,7 $= n_g \cdot s^2$		208.64213 $= \sum n_j \cdot$ lg s_j^2

$n_g \cdot s^2 = 450616,7$ 211.75614

$s^2 = \frac{450616,7}{54} = 8344,75$ -208.64213

3.11401 · 2,303 = 7,17156

$lg\ s^2 = 3.92141$

$n_g \cdot lg\ s^2 = 211.75614$

$\chi^2 = 7,171$; Tabellenwert für χ^2 (P=95 %; n=8) = 15,507

χ^2 (P=99 %; n=8) = 20,090

Die Standardabweichungen und damit die Zufallsfehler bei den Gehaltsbestimmungen aller Drogen sind somit vergleichbar.

11.11. Reproduzierbarkeit der Quantitativen DC - Methode:

Standardabweichung $s = \pm 0,09135\ \% = \pm 3,09\ \%$ rela

Gesamt-Streubereich aller Meßwerte $\Delta x = \pm 0,183\ \% = \pm 6,19\ \%$ rela

(bezogen auf einen mittleren Gehalt von 2,96 %)

12. Bestimmung des Verfahrensfehlers der untersuchten Drogenmuster Nr. I - IX, ermittelt aus den gemessenen Werten der Eichfunktion $y = b\,x + a$ mittels Regressionsrechnung, bezogen auf den mittleren Chiningehalt $\bar{x}_A$.

$$\text{Fehler } \Delta \bar{x}_A = \frac{t\,(P,n) \cdot s}{b} \sqrt{\frac{1}{N_j} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_A - \bar{y})^2}{b^2 \left[\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2/\right.}}$$

Es bedeuten:

N = Anzahl der Eichkurvenwerte (= 8)

N_j = Anzahl der Analysenwerte

$\bar{y}_A$ = Extinktionsmittelwert aus N_j Bestimmungen
(≙ dem Durchschnittsgehalt der Droge)

$\bar{y}$ = Extinktionsmittelwert der Eichmessungen
(Eichkurve aus dc eluierten Werten) = 0,3456

n = N - 2 = 6

$t\ (P,n)$ = 2,45

s = Standardabweichung zwischen gemessenen und berechneten Eichkurvenwerten = 0,0055648

b = Anstieg der Eichgeraden = 0,015706

b^2 = 0,000246667

$\sum x_i^2$ = 5154,945544

$(\sum x_i)^2 / N = N \cdot \bar{x}^2$ = 4054,861458

Droge Nr. I : Cortex Chinae succir. DAB 6, ANZAG (1953):

$\bar{y}_A$ = 0,3223 ; N_j = 6 ;

$$\Delta \bar{x}_A = \frac{2{,}45 \cdot 0{,}005565}{0{,}015706} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{8} + \frac{(0{,}3223 - 0{,}3456)^2}{0{,}0002467 \cdot (5154{,}9455 - 4054{,}8615)}}$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}291667 + \frac{0{,}00054289}{0{,}271358}} =$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}293667} = 0{,}868113 \cdot 0{,}541911$$

$\Delta \bar{x}_A$ = 0,470 γ / ml

Droge Nr. II : Cortex Chinae succir. WOELM (VI,54):

$\bar{y}_A = 0{,}1960$; $N_j = 5$;

$$\Delta\bar{x}_A = 0{,}868113 \cdot \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{8} + \frac{(0{,}1960 - 0{,}3456)^2}{0{,}271358}}$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}407475} = 0{,}868113 \cdot 0{,}638337$$

$\Delta\bar{x}_A = 0{,}554\ \gamma$ / ml

Droge Nr. III : Cortex Chinae succir., San Thomé, WOELM :

$\bar{y}_A = 0{,}1395$; $N_j = 6$;

$$\Delta\bar{x}_A = 0{,}868113 \cdot \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{8} + \frac{(0{,}1395 - 0{,}3456)^2}{0{,}271358}}$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}448202} = 0{,}868113 \cdot 0{,}669479$$

$\Delta\bar{x}_A = 0{,}581\ \gamma$ / ml

Droge Nr. IV : Cortex Chinae succir. WOELM; 7,38 % T.A.; 2,69 %

Chininsulfat:

$\bar{y}_A = 0{,}2315 ; \quad N_j = 6 ;$

$$\Delta \bar{x}_A = 0{,}868113 \cdot \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{8} + \frac{(0{,}2315 - 0{,}3456)^2}{0{,}271358}}$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}339643} = 0{,}868113 \cdot 0{,}582789$$

$\Delta \bar{x}_A = 0{,}506 \gamma / ml$

Droge Nr. V : Chinarinde, "Boehringer", Muster 1 :

$\bar{y}_A = 0{,}1812 ; \quad N_j = 6 ;$

$$\Delta \bar{x}_A = 0{,}868113 \cdot \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{8} + \frac{(0{,}1812 - 0{,}3456)^2}{0{,}271358}}$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}391267} = 0{,}868113 \cdot 0{,}625513$$

$\Delta \bar{x}_A = 0{,}543 \gamma / ml$

Droge Nr. VI : Chinarinde, "Boehringer", Muster 2 :

$\bar{y}_A = 0{,}7127$; $N_j = 3$;

$$\Delta \bar{x}_A = 0{,}868113 \cdot \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{8} + \frac{(0{,}7127 - 0{,}3456)^2}{0{,}271358}}$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}954955} = 0{,}868113 \cdot 0{,}977218$$

$\Delta \bar{x}_A = 0{,}848 \ \gamma / \text{ml}$

Droge Nr. VII : Chinarinde, "Boehringer", Muster 3 :

$\bar{y}_A = 0{,}4293$; $N_j = 3$;

$$\Delta \bar{x}_A = 0{,}868113 \cdot \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{8} + \frac{(0{,}4293 - 0{,}3456)^2}{0{,}271358}}$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}0484150} = 0{,}868113 \cdot 0{,}695809$$

$\Delta \bar{x}_A = 0{,}604 \ \gamma / \text{ml}$

Droge Nr. VIII: Cortex Chinae DAB 6, ANZAG, vom 20.8.59 :

$\bar{y}_A = 0{,}1934$; $N_j = 12$;

$$\Delta \bar{x}_A = 0{,}868113 \cdot \sqrt{\frac{1}{12} + \frac{1}{8} + \frac{(0{,}1934 - 0{,}3456)^2}{0{,}271358}}$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}293700} = 0{,}868113 \cdot 0{,}541941$$

$\Delta \bar{x}_A = 0{,}470\ \gamma$ / ml

Droge Nr. IX: Cortex Chinae, DAB 6, ANZAG, vom 3.5.62 :

$\bar{y}_A = 0{,}1468$; $N_j = 9$;

$$\Delta \bar{x}_A = 0{,}868113 \cdot \sqrt{\frac{1}{9} + \frac{1}{8} + \frac{(0{,}1468 - 0{,}3456)^2}{0{,}271358}}$$

$$= 0{,}868113 \cdot \sqrt{0{,}381754} = 0{,}868113 \cdot 0{,}617863$$

$\Delta \bar{x}_A = 0{,}536\ \gamma$ / ml

Durchschnittswert für $\Delta \bar{x}_A$ aus 9 Drogen = 0,568 γ / ml

13. Berechnung des kleinsten noch gesichert nachweisbaren Meßwertes aus dem experimentell gemessenen Blindwert.

$$\bar{x}_u = \bar{x}_B + \frac{t\,(P,n) \cdot s_B}{\sqrt{N_j}}$$

Es bedeuten:

$\bar{x}_u$ = kleinster nachweisbarer Mittelwert aus N_j Messungen

$\bar{x}_B$ = mittlerer Blindwert = 0,0329 (bei 39 Messungen)

s_B = Standardabweichung der Blindwerte mit 38 Freiheitsgraden
= $\pm$ 0,0155

P = 99 %

n = 38

N_j = 9 (Anzahl der Drogenmuster)

$$\bar{x}_u = 0{,}0329 + \frac{2{,}712 \cdot 0{,}0155}{\sqrt{9}} = 0{,}0469 \; (= \bar{E}_u)$$

die Umrechnung in den Konzentrationsmaßstab erfolgt nach der Beziehung

$$E - \bar{E}_B = f \cdot c$$

für c = 20 γ / ml ergibt sich E zu 0,310;

$$\frac{0{,}310 - 0{,}033}{20} = 0{,}0138 \; (f_1)$$

für $c = 28{,}4\ \gamma$ / ml ergibt sich E zu 0,440;

$$\frac{0{,}440 - 0{,}033}{28{,}4} = 0{,}0143 \quad (f_2)$$

$$\bar{c} = \frac{\bar{E}_u - \bar{E}_B}{f}$$

$$= \frac{0{,}0469 - 0{,}0329}{0{,}0138} = \underline{1{,}014}$$

$$= \frac{0{,}0469 - 0{,}0329}{0{,}0143} = \underline{0{,}979}$$

Die kleinste, gesichert nachweisbare Konzentration $\bar{c}$ beträgt somit 0,98 - 1,01 γ Chinin / ml.

Literaturverzeichnis

1 Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, E.MERCK AG, Darmstadt 1961

2 ASSHAUER, E.:
Dtsch.med.Wochenschr. 93, 926 (1968)

3 AUTERHOFF, H.:
Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, 3.Auflage.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H.,
Stuttgart 1965, S. 39

4 AUTERHOFF, H., K.KALPATHY :
Pharmac. Acta Helvetiae 38, 491 (1963)

5 BERGER, F. :
Handbuch der Drogenkunde. Bd. 1.
Verlag W. MANDRICH, Wien 1949, S. 96 ff

6 BERNELOT MOENS, J.C. :
Arch. Pharmaz. 208, 24 (1876)

7 BESSLER, O. :
Planta med. 4, 93 (1956)

8 BÖHME, H., H.HOCKE :
Arch. Pharmaz. 290, 422 (1957); 292, 467 (1959);
293, 342 (1960)

9 BÖHME, H., H.LAMPE :
Arch. Pharmaz. 284, 227 (1951); 285, 175 (1952)

10 BÖHME, H., R.NEIDLEIN, E.TAUBER :
Arch. Pharmaz. 294, 315 (1961)

11 BRAECKMANN, P., R.VAN SEVEREN, L.DE JAEGER VAN MOESEKE :
Dtsch. Apoth.-Ztg. 104, 1211 (1964)

12 British Pharmacopeia 1963

13 De Analyse van de Kinabast
Mededeeling Kina-Proefstation Nr. 1, Batavia 1912

14 DETHLOFF, W. :
Chinin. Verlag Chemie G.m.b.H., Berlin W 35, 1944

15 Dtsch. Apoth.-Ztg. 107, 180 (1967)

16 Deutsches Arzneibuch, 7. Ausgabe der Deutschen
Demokratischen Republik, 1964

17 DIEPGEN, P. :
Dtsch. Apoth.-Ztg. 92, 740 (1952)

18 Documenta GEIGY, wissenschaftliche Tabellen. 6.Auflage
J.R.GEIGY AG, Basel 1960

19 DOERFFEL, K. :
Beurteilung von Analysenverfahren- und Ergebnissen.
2.Auflage. SPRINGER-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York,
J.F.BERGMANN, München 1965

20 ECKSCHLAGER, K. :
Fehler bei chemischen Analysen
Akademische Verlagsgesellschaft GEEST & PORTIG KG,
Leipzig 1964

21 EDER, R., O.RUCKSTUHL :
Pharmac. Acta Helvetiae 18, 336 (1943)

22 EISENBRAND, J. :
Fluorimetrie
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H.,
Stuttgart 1966

23 GÄNSHIRT, H. :
s. Nr. 153, S. 133 ff

24 GÄNSHIRT, H., K.MORIANZ :
Arch. Pharmaz. 293, 1065 (1960)

25 GEISS, F., H.SCHLITT, A.KLOSE :
Z. anal. Chem. 213, 321 (1965)

26 GIDDINGS, J.C., R.C.KELLER :
Advances in Chromatography, Vol. 1
MARCEL DEKKER Inc., New York 1965, S. 144

27 GOODMANN, L.S., A.GILMAN :
The Pharmacological Basis of Therapeutics. 3rd Edit.
The MCMILLAN Company, New York, London, Toronto 1965,
S. 1105 ff

28 GOTTSCHALK, G. :
Statistik in der quantitativen chemischen Analyse.
Schriftenreihe "Die chemische Analyse", Bd. 49.
F.ENKE Verlag, Stuttgart 1962

29 GOUTARD, R., M.M.JANOT, V.PRELOG, W.J.TAYLOR :
Helv. Chim. Acta 33, 152 (1950)

30 HADORN, H., K.ZÜRCHER :
Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. 55, 194 (1964)

31 HAGGIS, A.W. :
Bull. History Med. 10, 417, 568 (1941)

32 HALPAAP, H. :
Chemie-Ing.-Techn. 35, 488 (1963)

33 HAYDN, A.L., O.R.SAMUEL :
J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit. 49, 497 (1960)

34 HENRY, T.A. :
The Plant Alkaloids.
J. & A. CHURCHILL ltd., London 1949, S. 417 ff

35 HESSE, O. :
Liebigs Ann.Chem. 146, 364 (1868)

36 HESSE, O. :
Ber.Dtsch.Chem.Ges. 4, 692 (1871)

37 HESSE, O. :
Liebigs Ann.Chem. 176, 206, 208, 323 (1875)

38 HESSE, O. :
Liebigs Ann.Chem. 182, 128 (1876)

39 HESSE, O. :
Pharmaz. Ztg. 32, 259 (1887)
Liebigs Ann.Chem. 166, 217 (1873); 243, 131 (1888)

40 HESSE, O. :
Pharmac. J. Transact. 16, 1025 (1886)

41 HILLE, W. :
Arch. Pharmaz. 241, 54 (1903)

42 HONEGGER, C.G. :
Helv. Chim. Acta 45, 1413 (1962)

43 HOPPE, H.A. :
Drogenkunde, 7. Auflage
Verlag CRAM, DE GRUYTER & CO, Hamburg 1958, S. 222

44 HUMMEL, K. :
Herkunft und Geschichte der pflanzlichen Drogen.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H.,
Stuttgart 1952

45 JACHONTOV, L.N., L.J.MASTAFANOVA, SL.PORTNOVA,
M.V. RUBCOW :
Doklady Akaad. Nauk SSSR 162, 1075 (1965)

46 JOHANSON, E. :
Arch. Pharmaz. 210, 418 (1877)

47 KAISER, R. :
Quantitative Bestimmung organischer funktioneller
Gruppen. Schriftenreihe "Methoden der Analyse in der
Chemie" Bd. 4.
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main 1966

48 KAMP, W., W.J.M.ONDERBERG, W.A.VAN SETERS :
Pharmac. Weekbl. 98, 993 (1963)

49 KERNER, G., A.WELLER :
Arch. Pharmaz. 225, 112, 712, 754 (1887)

50 KÖLLER, H. :
Dtsch. Apoth.-Ztg. 99, 60 (1959)

51 KORTÜM, G., W.HESS :
Z. physik. Chemie 19, 142 (1959)

52 KRUMMEL, G. :
Zur Wertbestimmung von Chinarinden
Nat. Diss. Marburg 1958, S. 12

53 KUSCHINSKY, G. :
Taschenbuch der modernen Arzneibehandlung. 3. Auflage.
GEORG THIEME-Verlag, Stuttgart 1963

54 KUSCHINSKY, G., H.LÜLLMANN :
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
GEORG THIEME-Verlag, Stuttgart 1964, S. 242 ff

55 LEBRUN, J., M.WARLET, G.SCHICHAREVITCH :
Ind. Chim. Belge 15, 329 (1950)

56 LEHMANN, G., H.G.HAHN, P.MARTINOD :
Z. anal. Chem. 227, 81 (1967)

57 LENDLE, A. :
Pharmaz. Ztg. 82, 879 (1937)

58 LIEBIG, J. :
Ann. Physik 21, 26 (1831)

59 LIPPERT, E., W.NÄGELE, J.SEIBOLD-BLANKENSTEIN,
U.STAIGER, W.VOSS :
Z. anal. Chem. 170, 1 (1959)

60 MANSKE, R.H.F., H.L.HOLMES :
The Alkaloids, Chemistry and Physiology. Vol. III
Academic Press Inc., Publishers, New York 1958

61 MATHIEU, J.P., M.M.JANOT :
Optical rotary power selected constants. Vol. IV
Alkaloids.
Pergamon Press, London, Paris, New York, Los Angeles,
Frankfurt/Main 1959

62 MÜLLER, K.H., H.HONERLAGEN :
Mitt. Dtsch. Pharmaz. Ges. 30, 202 (1960)

63 MUNTER, F. :
Chemiker-Ztg. 87, 656 (1963)

64 OELSCHLÄGER, H., J.VOLKE, G.T.LIM :
Arch. Pharmaz. 298, 213 (1965)

65 OSWALD, N., H.FLÜCK :
Pharmac. Acta Helvetiae 39, 293 (1964)

66 OUDEMANS jr., A.C. :
Liebigs Ann.Chem. 182, 33 (1876)

67 PARIS, R.R., M.PARIS :
Bull. Soc. chim. France 1963, 1597

68 PELLETIER, P.J., J.B.CAVENTOU :
Ann. Chim. et Phys. 15, 348 (1820)

69 Pharmacop. Nordica, Ed. Danica, Vol. II, 1963

70 Pharmacopeia of the United States of America,
U.S.P. XVII, 1965

71 Pharmaz. Ztg. 112, 582 (1967)

72 Pharmaz. Ztg. 112, 1313 (1967)

73 Pharmaz. Ztg. 111, 1299 (1966)

74 PIRLOT, G. :
Bull. Soc. chim. belges 59, 327 (1950)

75 PLEAT, G.B., J.H.HARLEY, S.E.WIBERLEY :
J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. 40, 107 (1951)

76 PRELOG, V., O.HÄFLIGER :
Helv. Chim. Acta 33, 2021 (1950)

77 PRELOG, V., E.ZALAN :
Helv. Chim. Acta 27, 545 (1944)

78 RABE, P. et al. :
Liebigs Ann. Chem. 492, 242 (1932)

79 RABE, P., W.SCHULER :
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 76, 251 (1943)

80 RABE, P., A.SCHULTZE :
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 66, 120 (1933)

81 RAGAZZI, E., G.VERONESE :
Mikrochim. Acta 1965, 966

82 RECHE, O.R. :
Zur quantitativen Bestimmung des Chinins in China-alkaloidgemischen und Chinarinde.
Nat. Diss. Marburg 1955, S. 14

83 REGNAULT, H. :
Liebigs Ann.Chem. 68, 116 (1848); 26, 12 (1838)

84 ROTH, H.J. :
Pharmazie 16, 257 (1961)

85 SCHMIDT, J.H. :
Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 33, 594 (1892);
ref. in Z. anal. Chem. 32, 260 (1893)

86 SCHULEK, E., J.KOVACZ :
Z. anal. Chem. 121, 21 (1941)

87 SEVEREN, R. VAN,
J. Pharmac. Belgique 17, 40 (1962)

88 SPENCER, O.C., B.H.BEGGS :
J. Chromatog. 21, 52 (1966)

89 SPIEGEL 21, 73 (1967)

90 STAHL, E. :
Dünnschichtchromatografie, ein Laboratoriumshandbuch,
SPRINGER-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967,
2. Auflage, S. 133 ff

91 STARKENSTEIN, E. :
Lehrbuch der Pharmakologie, Toxikologie und Arzneiverordnungslehre
Verlag F.DEUTICKE, Leipzig u. Wien 1938, S. 146 ff

92 STIMSON, M.M., M.A.REUTER :
J. Amer. Chem. Soc. 68, 1192 (1946)

93 STOLL, A., E.JUCKER :
Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, 3. Auflage,
Bd. 3, S. 210
Verlag URBAN & SCHWARZENBERG, München und Berlin 1953

94 STRECKER, A. :
Liebigs Ann.Chem. 91, 155 (1854)

95 SUSZKO-PURZYCKA, A., W.TRZEBNY :
J. Chromatog. 16, 239 (1964); 17, 114 (1965)

96 THRON, H., W.DIRSCHERL :
Liebigs Ann. Chem. 515, 252 (1935)

97 UTERMARK, W., W.SCHICKE :
Molekulargewichts- und Schmelzpunkttabellen organischer Verbindungen
Verlag F.VIEWEG & SOHN, Braunschweig 1963

98 VÁCHA,P., P.ČUBA, Vl.PREININGER, L.HRUBAN, F.SANTAVÝ :
Planta med. 12, 406 (1964)

99 VIEBÖCK, F., A.SCHWAPPACH :
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 63 B, 2818 (1930)

100 WALDI, D., K.SCHNACKERZ, F.MUNTER :
J. Chromatog. 6, 61 (1961)

101 WEBER, U.:
Süddtsch. Apoth.-Ztg. 87, 97 (1947)

102 WOJAHN, H., K.ERDELMEIER :
Dtsch. Apoth.-Ztg. 54, 226 (1939)

103 WHERRY, E.T., E.YANOVSKY :
J. Amer. chem. Soc. 40, 1063 (1918)

Lebenslauf

28. 11. 1937	Geboren als Sohn des Lehrers Wilhelm Bitsch und seiner Ehefrau Irma, geb. Betsch, in Ober-Ostern, Kr. Erbach/ Odenwald.
1940	Versetzung meines Vaters nach Erzhausen bei Darmstadt.
Herbst 1943	Einschulung in die Volksschule in Erzhausen.
Herbst 1947 bis Frühjahr 1957	Besuch des Ludwig-Georgs-Gymnasiums in Darmstadt.
27. 2. 1957	Ablegung der Reifeprüfung an der gleichen Schule.
1. 4. 1957 bis 31. 3. 1959	Praktikantenzeit in der Nidda-Apotheke in Frankfurt/Main-Praunheim.
5. 3. 1959	Ablegung des Pharmazeutischen Vorexamens in Wiesbaden.
Sommer-Sem. 1959	Studium der Naturwissenschaften an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main.
Winter-Sem. 1959 bis Sommer-Sem. 1962	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg/Lahn.
3. 10. 1962	Ablegung des Pharmazeutischen Staatsexamens an der Philipps-Universität.
November 1962 bis April 1963	Praktische Tätigkeit als Kandidat in der Stadt-Apotheke in Bremen-Vegesack.
Sommer-Sem. 1963 bis Sommer-Sem. 1964	Studium der Lebensmittelchemie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main.
7. 7. 1964	Ablegung der Hauptprüfung als Lebensmittelchemiker.

Seit 1. 11. 1964	Anfertigung der vorliegenden Dissertationsarbeit am Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg.
1. 12. 1964	Erteilung der Approbation als Apotheker mit Wirkung vom 6. 11. 1963
Seit 1. 4. 1966	Beschäftigung als wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität.
1. 4. 1966	Eheschließung mit Dr. Irmgard Hölscher.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Böhme, Diemair, Dimroth, Drawert, Egle, Kessler, Mahr, Nultsch, Rosenstock. Schmid, Schmitz, Siegert, von Stosch, Walcher, Wieland, Zinner.